

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SHIGATOXIN-BILDUNG  
BEI *ESCHERICHIA COLI*-STÄMMEN  
VON HAUSSCHWEINEN**



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**INES MARIA JOST**





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der  
Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2016

© 2016 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-306-0

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[info@dvg.de](mailto:info@dvg.de)  
[www.dvg.de](http://www.dvg.de)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

# **UNTERSUCHUNGEN ZUR SHIGATOXIN-BILDUNG BEI *ESCHERICHIA COLI*-STÄMMEN VON HAUSSCHWEINEN**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Ines Maria Jost**  
Tierärztin aus Bad Kreuznach

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind  
Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 12.01.2016

***„Non quia difficilia sunt non audemus, sed quia non audemus difficilia sunt.“***

SENECA

für meine Familie





Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**I. M. Jost\*, S. Barth, J. Fröhlich, R. Bauerfeind (2008):**

Effect of mitomycin C and UV irradiation on Stx2e production by porcine *Escherichia coli* strains *in vitro*. Poster, 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V., 21. – 24.9.2008, Dresden. Abstract in Int. J. Med. Microbiol. **298S2:26**

**I. M. Jost\*, R. Bauerfeind, J. Fröhlich (2010):**

Effects of antimicrobial agents on the release of Shiga toxin 2e by porcine *Escherichia coli* strains *in vitro*. Poster, 3. Gemeinsame Tagung der DGHM e. V. und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 28. - 31.03.2010, Hannover. Abstract in *BIOspektrum* Tagungsband 2010, S. 112

**I. M. Jost\*, R. Bauerfeind, J. Fröhlich (2010):**

Einfluss antimikrobieller Wirkstoffe auf die Stx2e-Freisetzung porciner *Escherichia coli*-Stämme *in vitro*. Poster, Fachgruppentagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 22. - 24.06.2010, Jena

**J. Fröhlich\*, I. M. Jost, S. Barth, R. Bauerfeind (2010):**

Shigatoxin (Stx)-Bildung bei Stx2e-kodierenden *Escherichia coli* (EDEC)-Stämmen von Schweinen. Vortrag, Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 22. - 24.06.2010, Jena

**J. Fröhlich\*, I. M. Jost, S. Barth, R. Bauerfeind (2010):**

Shigatoxin (Stx)-Bildung bei Stx2e-kodierenden *Escherichia coli* (EDEC)-Stämmen von Schweinen. Poster, III. EHEC-Workshop des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit und der Akademie für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 16. - 18.06.2010, Wildbad Kreuth

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Promotionsstipendium der Marianne und Dr. Fritz Walter Fischer-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft e. V.

Die für den Einband verwendete Zeichnung mit dem Titel „Hausschwein“ stammt von Birgit Steinke.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1 Struktur, Nomenklatur, Wirkungsweise und genetische Grundlagen von Shigatoxinen (Stx) .....	3
2.2 Lokalisation der Stx-Gene im Genom von <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.3 Regulation der Stx-Bildung.....	17
2.3.1 Induktion Stx-konvertierender Bakteriophagen.....	18
2.3.2 Weitere Mechanismen zur Regulation der Stx-Produktion .....	20
2.4 Einfluss exogener Faktoren auf die Stx-Bildung und/oder -Freisetzung bei STEC.	21
2.5 Freisetzung von Stx aus der Bakterienzelle .....	54
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>65</b>
3.1 Bakterienstämme .....	65
3.1.1 Kontrollstämme .....	65
3.1.2 STEC-2e-Feldstämme .....	67
3.1.3 Stämme zur Bestimmung von Cut-Off-Werten .....	68
3.1.4 Lagerung .....	68
3.2 Zelllinien und deren Kultivierung .....	68
3.3 Antikörper .....	68
3.4 Kontrollantigene.....	69
3.5 UV-Licht, Mitomycin C und Antiinfektiva .....	69
3.6 Bakterienanzucht unter Standardbedingungen.....	70
3.7 Bakterienanzucht bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen und -zeiten .....	70
3.8 Bakterienanzucht unter dem Einfluss von UV-Licht, Mitomycin C oder Antiinfektiva.....	71
3.8.1 UV-Licht .....	71
3.8.2 Mitomycin C .....	71
3.8.3 Antiinfektiva .....	72
3.9 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antiinfektiva und Mitomycin C.....	73
3.10 Gewinnung von Stx2e aus Bakterienkulturen .....	76
3.10.1 Gewinnung von Kulturüberständen .....	76

3.10.2	Gewinnung von Stx2e durch Bakterienzellaufschluss .....	77
<b>3.11</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration .....</b>	<b>77</b>
<b>3.12</b>	<b>Quantitativer Nachweis von Stx2e .....</b>	<b>78</b>
3.12.1	Stx2e-ELISA.....	78
3.12.2	Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) .....	80
<b>3.13</b>	<b>Nachweis von induzierbaren, lytischen Bakteriophagen .....</b>	<b>82</b>
3.13.1	Induktion von Bakteriophagen .....	82
3.13.2	Plaquetest .....	84
3.13.3	<i>stx</i> <sub>2e</sub> -Phagentest.....	84
<b>3.14</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>85</b>
3.14.1	Multiplex-PCR .....	85
3.14.2	<i>stx</i> <sub>2</sub> -Typisierungs-PCRs .....	85
3.14.3	Agarosegelelektrophorese und Bilddokumentation .....	86
<b>3.15</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>88</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Merkmale der 30 ausgewählten STEC-2e-Stämme von Schweinen .....</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Etablierung und Validierung des Stx2e-ELISA .....</b>	<b>90</b>
<b>4.3</b>	<b>Stx2e-Bildung porciner STEC-2e-Feldstämme unter Standardanzuchtbedingungen .....</b>	<b>98</b>
4.3.1	Stx2e-Nachweis mit dem Stx2e-ELISA .....	98
4.3.2	Stx2e-Nachweis mit dem Verozell-Zytotoxizitätstest .....	105
4.3.3	Korrelation zwischen den Ergebnissen aus dem Stx2e-ELISA und dem Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) .....	107
<b>4.4</b>	<b>Einfluss von exogenen Faktoren auf die Stx2e-Freisetzung bei porcinen STEC-2e-Feldstämmen .....</b>	<b>109</b>
4.4.1	Einfluss der Inkubationstemperatur und -dauer .....	109
4.4.2	Einfluss von UV-Licht, Mitomycin C und Antiinfektiva .....	111
4.4.2.1	Einfluss von UV-Licht .....	111
4.4.2.2	Einfluss von Mitomycin C .....	113
4.4.2.3	Einfluss von Antiinfektiva .....	115
<b>4.5</b>	<b>Vorkommen von induzierbaren, lytischen Bakteriophagen bei porcinen STEC-2e-Feldstämmen .....</b>	<b>130</b>
4.5.1	Bakteriolytische Effekte unter dem Einfluss von Norfloxacin, anderen Antiinfektiva, Mitomycin C oder UV-Licht .....	130
4.5.2	Plaques-erzeugende Aktivität nach Behandlung der STEC-2e-Feldstämme mit Norfloxacin, anderen Antiinfektiva, Mitomycin C oder UV-Licht .....	132
4.5.3	Untersuchungen auf <i>stx</i> <sub>2e</sub> -positive Bakteriophagen.....	139
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>141</b>
<b>5.1</b>	<b>Stx2e-Nachweis mittels ELISA-Technik .....</b>	<b>141</b>

---

5.2	Stx2e-Bildung und -Freisetzung bei STEC-2e-Stämmen vom Schwein unter Standardanzuchtbedingungen .....	145
5.3	Stx2e-Bildung und/oder -Freisetzung bei porcinen STEC-2e-Stämmen nach UV-Exposition oder unter der Einwirkung von Mitomycin C oder therapierelevanten Antiinfektiva.....	151
5.4	Untersuchung auf Stx2e-konvertierende Bakteriophagen bei porcinen STEC-2e-Stämmen .....	162
5.5	Fazit und Schlussfolgerungen.....	166
6	Zusammenfassung.....	168
7	Summary.....	170
8	Literaturverzeichnis .....	172
9	Anhang.....	191
9.1	Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	191
9.2	Verwendete Puffer, Lösungen und Medien .....	199
	Danksagung.....	204
	Erklärung .....	205

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
<i>A. demin.</i>	lat. <i>Aqua demineralisata</i>
abs.	absolut
ad	lat. <i>bis zu</i>
AMX	Amoxicillin
AS	Aminosäure
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
AVID	Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik, Fachgruppe der DVG
BA	Blutagar (5 % Schafblutanteil)
BAP	Blutagar-Platte (5 % Schafblutanteil)
BHI	engl. <i>brain heart infusion</i> , Hirn-Herz-Infusion
bp	engl. <i>base pair(s)</i> , Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD <sub>50</sub>	zytotoxische Dosis 50 %
CLSI	engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COL	Colistin
d. h.	das heißt
DI	Diarrhö
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	Strukturgen des Intimins
ED	engl. <i>Edema Disease</i> , Ödemkrankheit der Absatzferkel
EDEC	<i>Edema Disease E. coli</i> ; in dieser Arbeit <i>E. coli</i> -Stämme mit den Genen <i>stx<sub>2e</sub></i> und <i>fedA</i>
EDEC/ETEC	<i>Edema Disease E. coli</i> /enterotoxische <i>E. coli</i> ; in dieser Arbeit <i>E. coli</i> -Stämme mit den Genen <i>stx<sub>2e</sub></i> und <i>fedA</i> sowie Genen für wenigstens ein <i>E. coli</i> -Enterotoxin
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
<i>ehxA</i>	Strukturgen des EHEC-Hämolsins/Enterohämolsins
ELISA	engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>elt</i>	Strukturgen für hitzelabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin LT-I
EM	Erythromycin
EMA	engl. <i>European Medicines Agency</i> , Europäische Arzneimittel-Agentur
ENR	Enrofloxacin
<i>estah</i>	Strukturgen für hitzestabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin ST-Ih
<i>estap</i>	Strukturgen für hitzestabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin ST-Ip
<i>estb</i>	Strukturgen für hitzestabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin ST-II

EUCAST	engl. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
f. c.	engl. <i>final concentration</i> , Endkonzentration
F4	F4-Fimbrien
F5	F5-Fimbrien
F6	F6-Fimbrien
F18	F18-Fimbrien
F41	F41-Fimbrien
Fa.	Firma
FKS	Fötales Kälberserum
faeG	Strukturgen für F4-Fimbrienprotein
fanA	Strukturgen für F5-Fimbrienprotein
fasA	Strukturgen für F6-Fimbrienprotein
fedA	Strukturgen für F18-Fimbrienprotein
fim41A	Strukturgen für F41-Fimbrienprotein
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gb3	Globotriaosylceramid
Gb4	Globotetraosylceramid
h	Stunde(n)
HeLa-Zellen	Zelllinie aus humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEp	humanes Larynxkarzinom-Epithel
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hly	$\alpha$ -Hämolyse auf Schafblutagar
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IE	Internationale Einheit
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen
inkl.	inklusive, einschließlich
IS	Insertionselement
k. A.	keine Angabe(n)
kBp	Kilobasenpaare
KbE	Kolonie-bildende Einheit(en)
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
log	Logarithmus
log <sub>2</sub>	lat. <i>logarithmus dualis</i> , Logarithmus zur Basis 2
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus, Logarithmus zur Basis 10
LT-I	hitzelabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin I
M	Molarität
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute
MHK	Minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
MLST	engl. <i>Multi Locus Sequence Typing</i>
mM	millimolar
mm	Millimeter
MMC	Mitomycin C
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MV	Membranvesikel
n. t.	nicht typisierbar
n. u.	nicht untersucht
NaCl	Natriumchlorid

neg.	negativ
nm	Nanometer
NEO	Neomycin
Nr.	Nummer
o.	oder
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
OG	Obergrenze
ORF	engl. <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-Tween	PBS mit Zusatz von Tween 20®
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PbE	Plaque-bildende Einheit(en)
pM	pikomolar
pmol	Pikomol
pos.	positiv
PWD	engl. <i>Postweaning Diarrhea</i> , Durchfallerkrankung nach dem Absetzen
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
sonst.	sonstige
s	Sekunde
ST-Ih	humanes hitzestabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin Typ I
ST-Ip	porcines hitzestabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin Typ I
ST-II	hitzestabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin Typ II
STEC	Shigatoxin-kodierende <i>Escherichia coli</i>
STEC-2e	Shigatoxin 2e-kodierende <i>Escherichia coli</i>
STEC-2e, sonstige	in dieser Arbeit <i>E. coli</i> -Stämme mit den <i>stx</i> <sub>2e</sub> -Genen, aber ohne Gene für die F4-, F5-, F6-, F18-, F41-Fimbrien oder <i>E. coli</i> -Enterotoxine
Stx	Shigatoxin
<i>stx</i>	Strukturgene des Stx
Stx2e	Shigatoxin-Subtyp Stx2e
StxA	A-Untereinheit von Stx
StxB	B-Untereinheit von Stx
syn.	synonym
TAE	Tris-Acetat- EDTA
TC	Tetrazyklin
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
U	engl. <i>unit</i> , Einheit
u.	und
u. a.	unter anderem
UG	Untergrenze
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VE	Verenden
Vero-ZT	Verozell-Zytotoxizitätstest
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxin-kodierende <i>Escherichia coli</i>



## 1 Einleitung

Die Ödemkrankheit (*Edema Disease*, ED) ist eine weltweit verbreitete, wirtschaftlich bedeutsame Erkrankung der Schweine, welche bevorzugt bei Ferkeln ein bis zwei Wochen nach ihrem Absetzen von der Mutter auftritt. Ursache der Erkrankung ist eine Darminfektion mit Bakterien der Spezies *Escherichia coli*, welche durch die Bildung des Shigatoxin-Subtyps Stx2e und der F18-Fimbrien gekennzeichnet sind (*Edema Disease E. coli*, EDEC). EDEC-Stämme gehören definitionsgemäß zum Pathovar der Shigatoxin-bildenden *E. coli*, STEC. Stx2e ist aufgrund seiner Zytotoxizität (O'Loughlin und Robins-Browne 2001) als entscheidender Virulenzfaktor verantwortlich für das klinische Erscheinungsbild der ED (Linggood und Thompson 1987), welches durch Ödeme in verschiedenen Geweben und neurologische Ausfälle mit Todesfolge gekennzeichnet ist (Moxley 2000). Für einige Shigatoxin-Subtypen ist belegt, dass ihre Gene eigentlich ein Bestandteil chromosomal integrierter Bakteriophagengenome, sog. Prophagen, sind (Herold *et al.* 2004). Gene dieser Prophagen werden teilweise auch schon im Rahmen des bakteriellen Vermehrungszyklus transkribiert und exprimiert. Außerdem kann die Expression von Genen des Prophagen durch exogene Faktoren stimuliert werden. Im Falle von Stx-kodierenden Prophagen kann dies auch zu einer gesteigerten Shigatoxin-Produktion *in vitro* führen (Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000, Köhler *et al.* 2000). Da diese stimulierende Wirkung auf die Stx-Bildung auch bei EHEC-Stämmen beobachtet wird, ist der Einsatz von Antibiotika bei EHEC-Infektionen des Menschen umstritten. Aus den bisher vorliegenden Daten lässt sich ableiten, dass sich die therapeutische Gabe von Antibiotika sowohl schützend, aber genauso nachteilig auf den Verlauf einer EHEC-Infektion auswirken kann, indem sie das Auftreten schwerwiegender Folgeerkrankungen wie das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) fördert (Panos *et al.* 2006).

Wahrscheinlich befinden sich auch die Stx2e-Gene (*stxA<sub>2e</sub>*, *stxB<sub>2e</sub>*) der EDEC immer im Genom von Prophagen und unterliegen daher einer sehr komplexen Transkriptionskontrolle. Ob die Stx2e-Bildung im Verlauf der Infektion hochreguliert wird und erst diese Aufregulation zum dramatischen Verlauf der Infektion führt, ist gegenwärtig unbekannt. Eventuell stimulieren Faktoren des betroffenen Wirtsorganismus, die Futterzusammensetzung oder exogen zugeführte antimikrobielle Chemotherapeutika („Antibiotika“) die Stx2e-Bildung in der genannten Weise. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Effekt verschiedener physikalischer und chemischer Faktoren auf die Stx2e-Produktion an porcinen EDEC-Feldisolaten untersucht werden. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen standen zum einen Mito-mycin C und UV-Licht, die bekanntermaßen die Stx-Bildung bei STEC-Stämmen von Rindern oder Menschen aktivieren sowie die Antiinfektiva Amoxicillin (AMX), Colistin (COL),

Enrofloxacin (ENR), Erythromycin (EM), Neomycin (NEO) und Tetrazyklin (TC), welche in der Ferkelaufzucht häufig zur Therapie oder Metaphylaxe bakterieller Infektionskrankheiten eingesetzt werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Struktur, Nomenklatur, Wirkungsweise und genetische Grundlagen von Shigatoxinen (Stx)

Shigatoxine (Stx) haben als Virulenzfaktoren in der Pathogenese von STEC-bedingten Erkrankungen eine herausragende Bedeutung. Die Bezeichnung Shigatoxin leitet sich von einem erstmals bei *Shigella dysenteriae* Typ 1 nachgewiesenen Zytotoxin ab (Conradi 1903), welches den Stx-Prototyp darstellt. Konowalchuk *et al.* (1977) beschrieben 1977 die zytotoxische Wirkung von Kulturfiltraten mehrerer *E. coli*-Stämme auf Verozellen und bezeichneten das auslösende Agens als Verotoxin. Die Ähnlichkeit dieses Zytotoxins zu demjenigen von *S. dysenteriae* wurde durch den Vergleich biologischer und struktureller Eigenschaften (O'Brien und LaVeck 1983) und die erfolgreiche Neutralisation des unbekannten *E. coli*-Toxins durch Antiserum gegen das bekannte Shigatoxin von *S. dysenteriae* (O'Brien *et al.* 1982) erkannt.

#### Struktur

Die Shigatoxine (Stx) sind heterohexamere Proteinmoleküle, die nach dem A<sub>1</sub>B<sub>5</sub>-Prinzip aufgebaut sind. Das Stx-Holotoxinmolekül besteht aus einem Molekül eines katalytisch aktiven Proteins, genannt A-Untereinheit (32 kDa) und fünf identischen Molekülen eines kleineren Proteins, der sog. B-Untereinheit (je 7,7 kDa), welche sich zu einem Ring um die A-Untereinheit zusammenlagern und die Bindung an Rezeptoren auf entsprechenden Zielzellen vermitteln (Jackson *et al.* 1987a, O'Brien und Holmes 1987, Strockbine *et al.* 1988, Paton und Paton 1998). Die A-Untereinheit besitzt die beiden Domänen A<sub>1</sub> (27 kDa) und A<sub>2</sub> (6 kDa), die kovalent und durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

#### Nomenklatur

Aufgrund ihres im Grunde identischen molekularen Bauplans und ihrer gleichen molekularen Wirkungsweise werden das *Shigella*-Toxin und die strukturell eng verwandten Zytotoxine aus *E. coli* und anderen Bakterienarten gemäß Nomenklatur nach Calderwood *et al.* (1996) heute einheitlich als Shigatoxine (Synonym Verotoxine) bezeichnet. Im Jahr 2012 schlugen Scheutz und weitere Untersucher eine Reversion der Stx-Nomenklatur vor, um sie weiter zu vereinheitlichen und an neue Erkenntnisse anzupassen (Scheutz *et al.* 2012). Grundlage dieser Nomenklatur ist die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Shigatoxinen untereinander, wie sie mit Methoden der Bioinformatik anhand der Aminosäuresequenzen der A- und der B-Untereinheit quantifiziert werden (Scheutz *et al.*

2012). Die Aminosäuresequenz des *S. dysenteriae* I-Stammes „3818T“ diente dabei als Referenz für die weitere Analyse von Stx bzw. Stx1, während die Aminosäuresequenz des EHEC-Stammes „EDL 933“ als Referenz für die Analyse von Stx2 verwendet wurde. Shigatoxine, welche von *Shigella* spp. gebildet werden, werden als Stx (ohne arabische Ziffern) bezeichnet. Innerhalb der Stx-Typen Stx1 und Stx2 existieren jeweils mehrere Stx-Subtypen, welche zusätzlich zu den arabischen Ziffern mit lateinischen Kleinbuchstaben gekennzeichnet werden. Eine Stx-Variante bezeichnet wiederum eine Shigatoxinvariation innerhalb eines Stx-Subtyps, welche sich von einer anderen Variante desselben Stx-Subtyps in mindestens einer Aminosäure unterscheidet. Gegenwärtig unterscheidet man innerhalb der Familie der Shigatoxine die zwei Typen Stx1 und Stx2. Dabei umfasst der Stx1-Typ zur Zeit vier Subtypen Stx1a (Scheutz *et al.* 2012), Stx1c (Zhang *et al.* 2002), Stx1d (Bürk *et al.* 2003, Ohmura-Hoshino *et al.* 2003) und Stx1e (Probert *et al.* 2014). Das originäre Stx von *S. dysenteriae* Typ 1 und Stx1 von *E. coli* unterscheiden sich voneinander in nur einer Aminosäure (AS) an Position 45 der A-Untereinheit, wo bei Stx Threonin, bei Stx1 dagegen Serin vorkommt (Strockbine *et al.* 1988). Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von Stx und Stx1a beträgt 99,2 - 99,8 %, zwischen Stx1a und Stx1c beträgt sie 97 - 98,3 %, zwischen Stx1c und Stx1d sind es 95 - 96 % und zwischen Stx1a und Stx1d 95,4 - 95,9 % (Scheutz *et al.* 2012). Mit einer Nukleotidsequenzhomologie von 91 % und einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Stx1a und Stx1d von 95,4 - 95,9 % unterscheidet sich Stx1d am stärksten von Stx1a (Bürk *et al.* 2003, Scheutz *et al.* 2012).

Beim Stx2-Typ lassen sich gegenwärtig mindestens 7 Subtypen (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g) differenzieren. Der Stx2-Typ ist damit vielfältiger als der Stx1-Typ. Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz von Stx2a stimmt nur zu 58 % respektive 56 % mit der von Stx1a überein (Jackson *et al.* 1987a). Dementsprechend findet zwischen Stx1 und Stx2 keine Kreuzneutralisation statt (Scotland *et al.* 1985, Strockbine *et al.* 1986). Jedoch zeigen die Stx2-Subtypen und -Varianten - abhängig vom Grad ihrer Übereinstimmung - untereinander zumindest partielle Kreuzneutralisation (Mainil 1999).

In der vorliegenden Arbeit wird, sofern möglich, die Nomenklatur der Stx-Subtypen nach Scheutz *et al.* (2012) verwendet. Aufgrund der relativ jungen Nomenklatur ist jedoch nicht für alle in dieser Arbeit erwähnten bzw. untersuchten Stämme der Stx-Subtyp nach Scheutz *et al.* (2012) bekannt. In diesen Fällen wird auf die Originalbezeichnung des Stx-Subtyps zurückgegriffen, die in der Regel auf der Nomenklatur von Calderwood *et al.* (1996) beruht.

## Wirkungsweise

Trotz struktureller Unterschiede kommt die zytotoxische Wirkung bei allen Shigatoxinen in der Hauptsache durch denselben Mechanismus zustande. So erfolgt die Stx-Bindung an die

eukaryontischen Zielzellen über Glykolipide in der Zytoplasmamembran. Dabei handelt es sich je nach Typ und Subtyp um Globotriaosyl- (Gb3), Globotetraosylceramid (Gb4) oder Forssman-Glykosphingolipid (Forssman-GSL) (Lingwood *et al.* 1987, Waddell *et al.* 1988, De Grandis *et al.* 1989, Keusch *et al.* 1995, Müthing *et al.* 2012). Unterschiede hinsichtlich der Zielzellen und des Ausmaßes der zytotoxischen Wirkung auf Zellen *in vitro* und *in vivo* sind einerseits durch die Rezeptorausstattung der Zellen selbst und andererseits durch strukturelle Unterschiede in der B-Untereinheit begründet, welche die Rezeptoraffinität determinieren (De Grandis *et al.* 1989, Samuel *et al.* 1990, Keusch *et al.* 1995). Nach Bindung des Toxins an den Glykolipidrezeptor wird der Toxin-Rezeptor-Komplex über Clathrin-ummantelte Gruben von der Zielzelle internalisiert (Sandvig und van Deurs 1996). Die Stx-haltigen Endosomen gelangen nach Verschmelzung mit Lysosomen durch retrograden Transport über den *trans*-Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) (Sandvig 2001). Von hier wird das StxA<sub>1</sub>-Fragment in das Zytosol transloziert (Sandvig *et al.* 2002), was essentiell für dessen zytotoxische Wirkung ist. Das A<sub>1</sub>-Fragment gelangt per Diffusion zu den zellulären Ribosomen, wo es infolge seiner N-Glykosidase-Aktivität einen Adeninrest in Position 4.323 der 28S-rRNA im 60S-Anteil der Ribosomen abspaltet. Das Ribosom verliert mit dieser Schädigung seine Affinität zum eukaryotischen Elongationsfaktor eEF1. Damit unterbleibt die eEF1-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen, was gleichbedeutend mit der Blockade der Proteinbiosynthese an diesem Ribosom ist (Obrig *et al.* 1987, Endo *et al.* 1988, Ogasawara *et al.* 1988, Sandvig 2001). Das A<sub>1</sub>-Fragment ist im Stx-Holotoxin zunächst enzymatisch inaktiv. Seine enzymatische Aktivität, für die ein Glutaminsäurerest in Position 167 wesentlich verantwortlich ist (Hovde *et al.* 1988), erhält das Fragment erst in den Endosomen oder im *trans*-Golgi-Netzwerk, wenn es durch die membranständige Protease Furin vom Rest der A-Untereinheit abgespalten wird und auch die Disulfidbrücke zwischen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> durch Reduktion gelöst worden ist (Garred *et al.* 1995a, Garred *et al.* 1995b). Alternativ kann die A<sub>1</sub>-Domäne auch im Zytosol durch die Protease Kalpain abgespalten werden (Garred *et al.* 1995a, Sandvig *et al.* 2002). Die Hemmung der Proteinbiosynthese ist irreversibel und führt zum Tod der Zielzellen (Paton und Paton 1998). Bei den Stx-Zielzellen handelt es sich vor allem um Endothelzellen, die je nach betroffener Wirtsspezies vorwiegend in den kleinen Blutgefäßen der Nieren, von Gehirn und Rückenmark oder der Submukosa des Gastrointestinaltrakts lokalisiert sind (Mainil 1999).

Stx1 und Stx2 sind auch als direkte oder indirekte Auslöser des programmierten Zelltods (Apoptose) beschrieben worden (Sandvig und van Deurs 1996, Cherla *et al.* 2003). Beim indirekten Weg reduziert die Hemmung der Proteinbiosynthese die Expression von Apoptoseinhibitoren (Chen und Zychlinsky 1994). Beim direkten Weg kann einerseits die

Bindung von Stx an seinen zellulären Rezeptor eine Kinasekaskade anstoßen (Katagiri *et al.* 1999). Andererseits kann die Ribosomenschädigung zur „Stress-Aktivierung“ von Proteinkinasen führen und dies die Kaspasekaskade auslösen (Iordanov *et al.* 1997). Welcher Mechanismus bevorzugt in Gang gesetzt wird, ist auch vom Stx-Typ abhängig. So besitzt Stx2, nicht aber Stx1, ein Aminosäuresequenzmotiv, durch das es mit dem Apoptoseinhibitor Bcl-2 interagieren kann und schließlich Kaspase 3 aktiviert (Jones *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2000). Stx2e induziert vermutlich über die Rezeptor-vermittelte Aktivierung Apoptose in Vero-, nicht jedoch in HEp-2-Zellen (Ching *et al.* 2002).

Stx2e wirkt zytotoxisch auf die porcinen Endothelzellen und Myozyten in Gefäßen des Magen-Darm-Traktes und des Gehirns (Boyd *et al.* 1993, Matise *et al.* 2000). Daraus resultiert eine Mikroangiopathie (Boyd *et al.* 1993). Anders als beim Kaninchen führt Stx2e beim Schwein nicht zu einer Flüssigkeitsansammlung im Darmlumen (Gannon und Gyles 1990). Vereinzelt wird jedoch über eine Schädigung des Darmepithels berichtet (Boyd *et al.* 1993). Die Stx2e-induzierten neurologischen Ausfallserscheinungen, die für das klinische Bild der ED charakteristisch sind, sind vermutlich allein die Folge der Endothelschäden in Gehirngefäßen (Clugston *et al.* 1974, Imberechts *et al.* 1992, Meisen *et al.* 2013). Dabei führen in erster Linie nekrotische Prozesse zur Zerstörung der Arteriolen (Matise *et al.* 2000). Stx1 und Stx2 binden bevorzugt an Gb3-, weniger stark an Gb4-Rezeptoren. Stx2e präferiert dagegen Gb4 vor Gb3 (De Grandis *et al.* 1989, Keusch *et al.* 1995, Müthing *et al.* 2012). Stx2e ist darüber hinaus auch in der Lage, an Forssman-GSL zu binden, während Stx1 und Stx2 an diesem Rezeptor keine Bindungsaktivität aufweisen (Müthing *et al.* 2012). Gb3- und Gb4-Rezeptoren kommen beim Schwein in verschiedenen Geweben vor (Boyd *et al.* 1993). So konnten Gb3 und Gb4 in der Mikrovillimembran der Enterozyten des Jejunums und Ileums von Schweinen nachgewiesen werden (Waddell *et al.* 1996). Außerdem exprimieren primäre Endothelzellen, die aus dem Gehirn von Schweinen gewonnen wurden (sog. *primary porcine brain endothelial cells*, PBCECs), sowohl Gb3 als auch Gb4 (Meisen *et al.* 2013). Dagegen wurde Forssman-GSL bislang weder in den Zellen des Darmes noch in den PBCECs von Schweinen detektiert (Waddell *et al.* 1996, Meisen *et al.* 2013). Die von anderen Stx-Typen abweichende Rezeptorpräferenz des Stx2e wird den beiden AS Gln64 und Lys66 in der B-Untereinheit zugeschrieben (Tyrrell *et al.* 1992).

## Genetische Grundlagen

Jedes Stx wird durch ein Operon (*stxAB*) kodiert, dessen prinzipieller Aufbau für alle Stx gleich ist. Die beiden Strukturgene *stxA* und *stxB* bestehen aus je einem offenen Leserahmen (ORF) für die A- und die B-Untereinheit (Sung *et al.* 1990). Das Gen für die A-Untereinheit (*stxA*) befindet sich immer vor dem Gen für die B-Untereinheit (*stxB*).

Zwischen beiden Genen befindet sich eine intergenische Sequenz, deren Nukleotidanzahl vom Stx-Subtyp abhängig ist und bei Stx2e 15 Nukleotide beträgt (Weinstein *et al.* 1988b). Das Gen für die A-Untereinheit von Stx2e (*stxA<sub>2e</sub>*) besteht aus 957 Nukleotiden und das für die B-Untereinheit (*stxB<sub>2e</sub>*) aus 261 Nukleotiden (Weinstein *et al.* 1988b). Die Nukleotidsequenz von *stxA<sub>2e</sub>* ist zu 94 % homolog zu derjenigen von *stxA<sub>2a</sub>*, die Nukleotidsequenz von *stxB<sub>2e</sub>* zu 79 % zu derjenigen von *stxB<sub>2a</sub>*. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen sind zu 93 % bzw. nur zu 84 % homolog (Weinstein *et al.* 1988b). Die Nukleotidsequenzen der beiden Stx-Subtypen Stx2e und Stx2f sind zu 70,6 % (*stxA*) bzw. 98 % (*stxB*) homolog, was sich in AS-Sequenzhomologien von 72,4 % (A-Untereinheit) und 97,1 % (B-Untereinheit) widerspiegelt (Gannon *et al.* 1990). Die prozessierte A-Untereinheit von Stx2e (StxA2e) besteht aus 297 Aminosäuren und die prozessierte B-Untereinheit von Stx2e (StxB2e) besteht aus 68 Aminosäuren. Vor dem *stxA<sub>2e</sub>*-Gen, an den Nukleotidpositionen 218 - 222, ist die Sequenz für eine mutmaßliche Ribosomenbindungsstelle (RBS) lokalisiert. Eine zweite potenzielle RBS befindet sich in der intergenischen Region zwischen *stxA<sub>2e</sub>* und *stxB<sub>2e</sub>* (Nukleotide 1.203 - 1.207). Stromaufwärts von *stxA<sub>2e</sub>* befindet sich eine Promotorsequenz, welche identisch ist zu derjenigen von Stx2a (Weinstein *et al.* 1988b). Die Nukleotidsequenzen des Promotors und der RBS von Stx2e sind zudem identisch mit den entsprechenden Sequenzen der Promotoren und der RBS von Stx2a, Stx2d1 und Stx2d2 (Ito *et al.* 1990). Ein Transkriptionsterminator befindet sich stromabwärts vom Stop-Codon des *stxB<sub>2e</sub>*. Jede Untereinheit von Stx2e weist eine N-terminale Signalsequenz auf, welche im Falle von StxA2e 22 Aminosäuren umfasst, während die Signalsequenz von StxB2e 19 Aminosäuren lang ist (Weinstein *et al.* 1988b). Laut Strockbine *et al.* (1988) besitzen *stx* und *stx<sub>1a</sub>* Eisen-regulierte Operatorsequenzen. Bei dieser Operatorregion handelt es sich um eine den Promotor überlappende Sequenz aus 21 Nukleotiden mit Dyaden-Symmetrie, welche eine Bindungsstelle für das Fur-Protein darstellt (Calderwood *et al.* 1987, Calderwood und Mekalanos 1987, Calderwood und Mekalanos 1988). Ansonsten beziehen sich die Angaben zu den Operatoren des *stx*-Operons auf die Operatoren Stx-konvertierender Bakteriophagen. Der Operator des Stx2a-konvertierenden Bakteriophagen 933W weist drei Operatoren-*repeats* in der rechten Operatorregion (*O<sub>R</sub>*) und zwei Operatoren-*repeats* in der linken Operatorregion (*O<sub>L</sub>*) auf (Tyler *et al.* 2004). Der Operator des Stx1a-konvertierenden Bakteriophagen H-19B besitzt in der rechten Operatorregion (*O<sub>R</sub>*) vier *inverted repeats* (sich gegenläufig wiederholende Nukleotidsequenzen), bezeichnet mit *O<sub>R</sub>0* bis *O<sub>R</sub>3*. In der linken Operatorregion (*O<sub>L</sub>*) befinden sich drei *inverted repeats* (Shi und Friedman 2001). Bei dem Phagen VT1-Sakai wurden in beiden Operatorregionen jeweils drei Suboperatorsequenzen *O<sub>R1</sub>*, *O<sub>R2</sub>* und *O<sub>R3</sub>* bzw. *O<sub>L1</sub>*, *O<sub>L2</sub>* und *O<sub>L3</sub>* nachgewiesen (Yokoyama *et al.* 2000b). Der Stx2e-konvertierende Bakteriophage  $\phi$ P27 besitzt zwei mutmaßliche Operatoren, *O<sub>L</sub>* und *O<sub>R</sub>*, welche das Repressorgen *cl* flankieren. Jeder der beiden Operatoren be-

steht aus drei Suboperatoren:  $O_{L1}$  (bp 5.997 - 6.010),  $O_{L2}$  (bp 6.026 - 6.039) und  $O_{L3}$  (bp 6.061 - 6.074) sowie  $O_{R1}$  (bp 6.776 - 6.789),  $O_{R2}$  (bp 6.800 - 6.813) und  $O_{R3}$  (bp 6.832 - 6.845).



Tabelle 1: Stx-Typen und deren Subtypen

Stx- Typ	Stx- Subtyp	Referenzstamm	Serotyp	Herkunft	Anmerkungen	Referenz
Stx	keiner	<i>Shigella dysenteriae</i> 3818T	1	Mensch, Dysenterie	keine	Habib und Jackson (1992), Strockbine <i>et al.</i> (1988)
Stx1	Stx1a	<i>E. coli</i> EDL 933	O157:H7	Rinderhack	Stamm kodiert auch für <i>stx</i> <sub>2a</sub>	O'Brien <i>et al.</i> (1984)
	Stx1c	<i>E. coli</i> DG 131/3	O174:H8	Schaf, asymptomatisch	keine	Koch <i>et al.</i> (2001), Paton <i>et al.</i> (1995)
	Stx1d	<i>E. coli</i> MH1813	O8:K85ab:HR (ONT:H19)	Rind	keine	Bürk <i>et al.</i> (2003), Scheutz <i>et al.</i> (2012)
	Stx1e	<i>E. cloacae</i> M12X01451	k. A.	Mensch, Durchfall, AK	keine	Probert <i>et al.</i> (2014)
Stx2	Stx2a	<i>E. coli</i> EDL 933	O157:H7	Rinderhack	Stamm kodiert auch für <i>stx</i> <sub>1a</sub>	O'Brien <i>et al.</i> (1984)
	Stx2b	<i>E. coli</i> 031	O174:H21	Kind, SIDS	Stamm kodiert auch für <i>stx</i> <sub>2c</sub>	Paton <i>et al.</i> (1992)
	Stx2c	<i>E. coli</i> EH250 <i>E. coli</i> 031	O118:H12 O174:H21	Kind, AK Kind, SIDS	Stamm kodiert auch für <i>stx</i> <sub>2b</sub>	Pierard <i>et al.</i> (1998) Paton <i>et al.</i> (1992)
	Stx2d	<i>E. coli</i> C165-02	O73:H18	k. A.	keine	Persson <i>et al.</i> (2007)
	Stx2e	<i>E. coli</i> S1191	O139:K12:H1	Schwein, ED	keine	Weinstein <i>et al.</i> (1988b)
	Stx2f	<i>E. coli</i> T4/97	O128ac:[H2]	Taube	keine	Schmidt <i>et al.</i> (2000)
	Stxg	<i>E. coli</i> 7v	O2:H25	Rind	keine	Leung <i>et al.</i> (2003)

**Erläuterungen:** Stx-Nomenklatur nach Scheutz *et al.* (2012). **AK** Abdominale Krämpfe; **ED** Edema Disease, Ödemkrankheit;  
k. A. keine Angabe(n); **SIDS** Sudden Infant Death Syndrome, Plötzlicher Kindstod

## 2.2 Lokalisation der Stx-Gene im Genom von *Escherichia coli*

Molekulare Analysen der *stx*-flankierenden DNS-Regionen in STEC-Stämmen zeigten, dass diese Regionen stets Prophagensequenzen enthielten. Dabei waren die *Stx*-Gene immer in derjenigen Region jener Phagengene, welche erst in der späten Phase des Phagenzyklus transkribiert werden, lokalisiert. Daher gilt heute als gesichert, dass *Stx*-Gene generell im Genom von Prophagen kodiert sind (Unkmeir und Schmidt 2000, Schmidt 2001, Herold *et al.* 2004).

Für die *Stx*-Subtypen *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx2a*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e* und *Stx2g* ist belegt, dass deren Gene jeweils Teile des Genoms temperenter, lambdoider Bakteriophagen sind, welche als Prophagen in das bakterielle *E. coli*-Chromosom integriert sind (Strockbine *et al.* 1986, Huang *et al.* 1987, Jackson *et al.* 1987a, Jackson *et al.* 1987b, Muniesa *et al.* 2000, Koch *et al.* 2001, Teel *et al.* 2002, Strauch *et al.* 2004, Garcia-Aljaro *et al.* 2006). Auch die *stx*-Gene von *Shigella dysenteriae* (McDonough und Butters 1999) und *Shigella sonnei* (Beutin *et al.* 1999, Strauch *et al.* 2001) sind im Genom von Bakteriophagen lokalisiert. Mittlerweile liegen vollständige Genomsequenzdaten für Phagen vor, die Gene der *Stx*-Subtypen *Stx1a*, *Stx2a*, *Stx2c* und *Stx2e* enthalten (Makino *et al.* 1999, Miyamoto *et al.* 1999, Plunkett *et al.* 1999, Muniesa *et al.* 2000, Yokoyama *et al.* 2000b, Sato *et al.* 2003a, Sato *et al.* 2003b, Strauch *et al.* 2008). Alle analysierten *Stx*-konvertierenden Bakteriophagen besitzen demnach doppelsträngige DNS und gehören der Familie der Siphoviridae bzw. der Myoviridae sowie der Podoviridae an (Schmidt 2001, Beutin *et al.* 2012).

Die Integration des Phagen-genoms in das Genom der bakteriellen Wirtszelle erfolgt durch die ortsspezifische Rekombination zwischen dem Erkennungssequenzmotiv des Phagen-genoms, *attP*, und dem des Wirtsbakteriums, *attB*. Die sog. *Stx*-konvertierenden Bakteriophagen sind auf diese Weise in der Lage, ihre *Stx*-Gene *in vitro* und *in vivo* in das Genom von *E. coli*-Empfängerstämmen unterschiedlicher Sero- und MLST-Typen und in seltenen Fällen auch in das Genom anderer Bakterienarten (*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*) einzubringen (Acheson *et al.* 1998, Schmidt *et al.* 1999, James *et al.* 2001, Johansen *et al.* 2001, Strauch *et al.* 2001, Toth *et al.* 2003, Cornick *et al.* 2006, Serra-Moreno *et al.* 2007). *Stx*-konvertierende Bakteriophagen sind deshalb für die Verbreitung des Virulenzfaktors *Stx* und für die Konversion von *E. coli*-Bakterien zu STEC sowie die Entstehung von weiteren *Stx*-bildenden Bakterienstämmen innerhalb der Spezies *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* und *Acinetobacter haemolyticus* maßgeblich (Schmidt *et al.* 1993, Paton und Paton 1996, Grotiuz *et al.* 2006).

Im Phagen-genom ist das *stx*-Operon in einer Region lokalisiert, in der sich alle erst spät im Phagenreplikationszyklus transkribierten Gene befinden. Dabei liegt das *stx*-Operon stets

stromabwärts des Gens für den Antiterminator Q und stromaufwärts der Lysegene S, R und Rz. Diese Position des *stx*-Operons im Phagengenom begründet, warum die Expression des *stx*-Operons bei vielen dahingehend untersuchten STEC-Stämmen ebenfalls erst in der späten Phase der Phagenreplikation hochreguliert wird (siehe 2.3.1) (Karch *et al.* 1999, Plunkett *et al.* 1999, Friedman und Court 2001, Muniesa *et al.* 2003).

Stx-konvertierende Bakteriophagen wurden erstmals aus humanen EHEC der Serogruppen O26 und O157 isoliert. Der erste Stx1-kodierende Phage konnte im EHEC-Stamm H19 nachgewiesen werden (Scotland *et al.* 1983, Smith *et al.* 1983). Der Prototyp eines Stx2-kodierenden Phagen heißt 933W und wurde aus dem EHEC-Stamm EDL 933 isoliert (O'Brien *et al.* 1984). Aus vielen STEC sind allerdings keine Stx-kodierenden Phagen zu isolieren, weshalb man zunächst annahm, dass das *stx*-Operon bei diesen STEC-Stämmen ein originärer Bestandteil des Bakterienchromosoms sei, so auch bei den Stx2e-bildenden *E. coli*-Stämmen. Durch die fortschreitende Sequenzanalyse *stx*-flankierender Regionen (Karch *et al.* 1999, Unkmeir und Schmidt 2000, Herold *et al.* 2004) gilt es heute jedoch als gesichert, dass die Stx-Gene bei STEC-Stämmen generell mit den Genen von Prophagen assoziiert sind, unabhängig vom Serotyp der Stämme oder deren Herkunft aus Mensch oder Tier. Somit sind vermutlich alle STEC-Stämme als Lysogene von Stx-konvertierenden Phagen anzusehen. Dabei sind diese Prophagen nicht zwingend intakt und zum lytischen Vermehrungszyklus zu stimulieren. Sie können vielmehr durch Deletionen und Insertionen in unterschiedlichem Ausmaß defekt und dadurch nicht mehr in der Lage sein, vollständige und infektiöse Phagenpartikel hervorzubringen (Unkmeir und Schmidt 2000, Yokoyama *et al.* 2000b, Schmidt 2001, Wagner und Waldor 2002, Creuzburg *et al.* 2005). Beispielsweise ist der Phage VT2-Sakai in dem EHEC-Stamm O157:H7 Sakai infolge der Insertion des Insertionselementes IS629 replikationsdefizient (Makino *et al.* 1999). Wie bei *Shigella dysenteriae* Typ 1 können auch mehrere IS vorhanden sein und miteinander rekombinieren, so dass dadurch wichtige Phagengene deletiert werden (Strockbine *et al.* 1988, McDonough und Butterton 1999, Unkmeir und Schmidt 2000). Dabei ist das Ausmaß der Defizienz unterschiedlich. Es können sowohl regulative Elemente des Phagengenoms - wie Q,  $p_R$  und  $t_R$  (McDonough und Butterton 1999) - als auch Lysegene fehlen (Creuzburg *et al.* 2005). Außerdem kann der Prophage durch den Funktionsverlust seiner Exzisionase-Gene im Bakteriengenom immobilisiert sein (Creuzburg *et al.* 2005). Mutationen und die damit verbundene Replikationsdefizienz liegen vermutlich dem Phänomen zugrunde, dass mehrere, verschiedene Prophagen (bis zu 18 Stück) in ein- und demselben STEC-Stamm koexistieren können (Hayashi *et al.* 2001, Perna *et al.* 2001). Ungeachtet der Heterogenität hinsichtlich der Genomgröße und der Nukleotidsequenz der *stx*-flankierenden Regionen (Mosaikstruktur) sind die Genome aller bislang untersuchten Stx-kodierenden Prophagen

ähnlich modular aufgebaut. Mehrere Gene ähnlicher Funktion bilden als Genomabschnitt eine (Funktions-)einheit und können als solche gegeneinander ausgetauscht werden. Daher ist auch bei geringen Nukleotidsequenzhomologien zwischen den verschiedenen Stx-kodierenden Phagen deren funktionelle Struktur im Prinzip identisch. Die genomische Variabilität der Stx-konvertierenden Prophagen, ein Resultat aus Rekombinationen und Rearrangements, könnte eine Erklärung dafür sein, warum die STEC-Stämme unterschiedliche Mengen an Stx produzieren (Muniesa *et al.* 2003).

Intakte, das heißt replikationsfähige und infektionstüchtige Stx-konvertierende Bakteriophagen, wurden für die Stx-Subtypen Stx1a sowie Stx1c isoliert. Gleiches gilt für die Stx2-Subtypen Stx2a, Stx2c, Stx2d, Stx2e und Stx2g (Strockbine *et al.* 1986, Huang *et al.* 1987, Jackson *et al.* 1987a, Jackson *et al.* 1987b, Muniesa *et al.* 2000, Koch *et al.* 2001, Teel *et al.* 2002, Strauch *et al.* 2004, Garcia-Aljaro *et al.* 2006). Im Fall von Stx2d liegt nur das Gen der Variante Stx2d1-O91-B2F1 im Genom eines induzierbaren Bakteriophagen. Für die Variante Stx2d2-O91-B2F1 wird dagegen ein defekter Phage, CP-B2F1, angenommen (Teel *et al.* 2002, Gobius *et al.* 2003). Auch die Stx2d-Variante Stx2d-O6-NV206 wurde noch nicht im Genom eines induzierbaren Bakteriophagen identifiziert. Bei Stx2f-kodierenden STEC-Stämmen wurde bisher nur die Existenz von Prophagensequenzen (S-Gen) unmittelbar stromabwärts der Stx2f-Gene gezeigt (Unkmeir und Schmidt 2000).

Über einen natürlich vorkommenden, intakten Stx2e-konvertierenden Bakteriophagen wurde nach meiner Kenntnis bisher nur ein einziges Mal berichtet (Muniesa *et al.* 2000). Dieser Phage erhielt die Bezeichnung „ $\phi$ P27“ und stammte aus einem STEC-Isolat von einem menschlichen Patienten. Dieses Isolat besaß allerdings keine Ähnlichkeit zu typischen EDEC-Stämmen vom Schwein, da es nicht für F18-Fimbrien kodierte und sein O-Typ dem Serotypisierungsschema von Ørskov & Ørskov nicht zuzuordnen war (Muniesa *et al.* 2000). Aus STEC-Stämmen von Schweinen wurden Stx2e-konvertierende Phagen bislang noch nicht isoliert. Bei einigen dieser Stämme hat man allerdings entdeckt, dass das *stx<sub>2e</sub>*-Operon auch bei ihnen von Phagengenen flankiert wird. Deshalb geht man davon aus, dass dieses Operon bereits vor langer Zeit in das Genom dieser STEC-Gruppe gelangte und die dafür verantwortlichen Stx2e-konvertierenden Prophagen in der Folgezeit allmählich mutierten und darüber ihre Replikationsfähigkeit verloren (Recktenwald und Schmidt 2002, Beutin *et al.* 2008).

Tabelle 2: Überblick über die Eigenschaften Stx-konvertierender Bakteriophagen bei STEC-Stämmen

E. coli-Stamm					Weitere em- pfängliche E. coli- Stämme	Referenz
Phage	Stx- Typ	Morphologie, Genomgröße	Integrationsort	Bezeichnung (Serotyp)	Herkunft	Induzierbarkeit [Induktor <sup>1,2</sup> ]
VT1-Sakai	Stx1 <sup>†</sup>	47,9 kbp	yehV (Regulation der Bildung von Curli u. extrazellulärer Matrix)	RIMD 0509952 (O157:H7)	M, Sakai City, Japan, 1996	MMC <sup>1,2</sup> , f. c. 2 µg/ml
VT1-Sa	Stx1 <sup>†</sup>	n. a.	n. a.	RIMD 0509894 (O157:H7)	Sakai City, Japan, 1996	UV <sup>1</sup> (1,66 J/m <sup>2</sup> , 30 s) NFX <sup>1,2</sup> (f. c. bis 1 µg/ml)
H-19B	Stx1a	n. a.	n. a.	H19 (O26:H11)	M, DI, GB	MMC <sup>1</sup> , f. c. 5 µg/ml
CP-933V (früher 933J)	Stx1a	n. a.	yehV	EDL 933 (O157:H7)	Rinderhack (Hamburger), Michigan, USA, 1982	n. a.
Stx1Φ	Stx1 <sup>†</sup>	59.866 bp 167 ORFs	n. a.	Morioka V526 (O157:H7)	M, Japan, 1996	UV <sup>1</sup>

Fortsetzung der **Tabelle 2** auf der nächsten Seite

nicht K12 C600  
Yokoyama *et al.*  
(2000b)

K12 (W3110,  
nicht lysogen  
für λ)

K12 (C600)

Smith und Linggood  
(1971), Smith *et al.*  
(1983), Huang *et al.*  
(1986), Huang *et al.*  
(1987), Neely und  
Friedman (1998),  
GenBank-Nr.  
AF034975

Plunkett *et al.*  
(1999), Perna *et al.*  
(2001), Manning  
(2014)

Watarai *et al.* (1998),  
Sato *et al.* (2003b),  
GenBank-Nr.  
AP005153

Phage	Stx- Typ	Morphologie, Genomgröße	Integrationsort	E. coli-Stamm			Weitere em- pfängliche E. coli- Stämme	Referenz
				Bezeichnung (Serotyp)	Herkunft	Induzierbarkeit [Induktor <sup>1,2</sup> ]		
6220	Stx1c	lambdoid Kopf 69,5 - 75 nm Schwanz 25 nm ca. 60 kbp	Z2577 (Oxidoreduktase)	CB 6220 (O146:H21)	M, D	MMC <sup>1</sup> , f. c. 0,5 µg/ml	K12 (C600, DH5α, JM83)	Koch <i>et al.</i> (2001), Koch <i>et al.</i> (2003)
933W	Stx2a	hexagonaler Kopf, 70 nm, Schwanz kurz, 27 x 13 nm 61.670 bp	wrfA (Trp-Repressor- bindendes Protein)	EDL 933 (O157:H7)	Rinderhack (Hamburger), Michigan, USA, 1982	MMC <sup>1</sup> , f. c. 0,5 µg/ml UV <sup>1</sup> (0,2 kJ/m <sup>2</sup> )	K12 (LE392, k802)	Plunkett <i>et al.</i> (1999), Perma <i>et al.</i> (2001), Aertsen <i>et al.</i> (2005), Manning (2014)
VT2- Sakai	Stx2 <sup>±</sup>	62,7 kbp	wrfA	RIMD 0509952 (O157:H7)	M, Sakai City, Japan, 1996	MMC <sup>2</sup> , UV <sup>2</sup> , keine Angabe zur Dosis	keine Plaques auf K12 (C600)	Makino <i>et al.</i> (1999)
VT2-Sa	Stx2 <sup>±</sup>	60.942 bp	n. a.	RIMD 0509894 (O157:H7)	Sakai City, Japan, 1996	UV <sup>1</sup> (1,66 J/m <sup>2</sup> , 30 s), NFX <sup>1,2</sup> (f. c. bis 1 µg/ml)	K12 (W3110, nicht lysogen für λ)	Matsushiro <i>et al.</i> (1999), Miyamoto <i>et al.</i> (1999)
Stx2Φ-I	Stx2 <sup>±</sup>	Plaques 3 mm 61.765 bp 166 ORFs	wrfA	Okayama O-27 (O157:H7)	M, Japan, 1996	UV <sup>1</sup>	K12 (C600)	Watarai <i>et al.</i> (1998), Sato <i>et al.</i> (2003a)
Stx2Φ-II	Stx2 <sup>±</sup>	Plaques 1 mm 62.706 bp 170 ORFs	n. a.	Morioka V526 (O157:H7)	M, Japan, 1996	UV <sup>1</sup>	K12 (C600)	Watarai <i>et al.</i> (1998), Sato <i>et al.</i> (2003b), GenBank-Nr. AP005154
ΦSC370	Stx2 <sup>±</sup>	Kapsid iso- metrisch, 60 nm, Schwanz kurz	n. a.	370 (O157:H7)	M, F, E, Spanien, 2000	MMC <sup>1,2</sup> , (f. c. 0,5 µg/ml)	K12 (DH5α)	Muniesa <i>et al.</i> (2003)
ΦLC159	Stx2 <sup>±</sup>	Kapsid gestreckt, 45 x 90 nm, Schwanz lang	n. a.	159 (O157:H7)	M, DI, Spanien, 2000	MMC <sup>1,2</sup> , (f. c. 0,5 µg/ml)	K12 (DH5α)	Muniesa <i>et al.</i> (2003)

Fortsetzung der **Tabelle 2** auf der nächsten Seite

Phage	Stx- Typ	Morphologie, Genomgröße	Integrationsort	Bezeichnung (Serotyp)	E. coli-Stamm		Referenz
					Herkunft	Induzierbarkeit [Induktor <sup>1,2</sup> ]	
φ297	Stx2 <sup>2</sup>	n. a.	<i>yecE</i> (Funktion unbekannt)	EH297 (O157:H7)	M. HUS, Brüssel Belgien	Freisetzung des Phagen	K12 (K514)  De Greve <i>et al.</i> (2002)
P13374	Stx2a	Kopf hexagonal, Schwanz kurz, Genus <i>Podovirus</i> , 60.894 bp	<i>wrbA</i>	CB13374* (O104:H4)	Keimlinge, D, 2011	MMC <sup>1,2</sup> , (f. c. 0,5 µg/ml)	Beutin <i>et al.</i> (2012), Tzschoppe <i>et al.</i> (2012)
2851	Stx2c	Kopf hexagonal- gestreckt, 53 x 106 nm Schwanz lang, flexibel, 165 nm 57.248 bp	<i>sbxB</i> (Exonuklease I)	CB2851 (O157:NM)	M, DI, D, 1993	CPX <sup>1,2</sup> f. c. 0,15 µg/ml <sup>1</sup> f. c. 5 ng/ml <sup>2</sup>	Strauch <i>et al.</i> (2004), Strauch <i>et al.</i> (2008), GenBank-Nr. FM180578
φ1662a	Stx2d	n. a.	n. a.	EC1662a (O174:H21)	Rinderhack	MMC <sup>1</sup> , f. c. 1 µg/ml	K12 (Q358, recA <sup>1</sup> )  Gobius <i>et al.</i> (2003)
φ1720a	Stx2d	n. a.	n. a.	EC1720a (O174:H21)	Rinderhack	MMC <sup>1</sup> , f. c. 1 µg/ml	K12 (Q358, recA <sup>1</sup> )  Gobius <i>et al.</i> (2003)
φB2F1	Stx2d1	kleine, trübe Plaques Kopf hexagonal	n. a.	B2F1 (O91:H21)	M, HUS, Kanada, 1985	MMC <sup>1,2</sup> , f. c. 0,5 µg/ml CPX <sup>2</sup> , f. c. 25 ng/ml	Teel <i>et al.</i> (2002), Manning (2014)
φP27	Stx2e	trübe Plaques Partikel ca. 140 nm lang, hexagonaler Kopf (45 - 50 nm), Schwanz lang 42.575 bp	<i>yecE</i> (Funktion unbekannt)	2771/97 (ONT:-H-)	M, DI, Würzburg D, 1997	MMC <sup>1,2</sup> , f. c. 0,5 µg/ml	Muniesa <i>et al.</i> (2000), Recktenwald und Schmidt (2002)

Fortsetzung der **Tabelle 2** auf der nächsten Seite

Phage	Stx- Typ	Morphologie, Genomgröße	Integrationsort	Bezeichnung (Serotyp)	E. coli-Stamm		Referenz
					Herkunft	Induzierbarkeit [Induktor <sup>1,2</sup> ]	
S86	Stx2g	Kopf hexagonal, Schwanz kurz	unbekannt (nicht <i>wrbA</i> oder <i>yehV</i> )	S86 (O2:H25)	Abwasser vorwiegend bovinen Ursprungs	MMC <sup>1</sup> <i>f. c.</i> 0,8 µg/ml	<i>S. sonnei</i> 635 und 866 <sup>3</sup> , K12 (DH5α, C600)  Garcia-Aljaro <i>et al.</i> (2006)
S134	Stx2g	Kopf hexagonal, Schwanz kurz	unbekannt (nicht <i>wrbA</i> oder <i>yehV</i> )	S134 (O2:H25)	Abwasser vorwiegend bovinen Ursprungs	MMC <sup>1</sup> , <i>f. c.</i> 0,8 µg/ml	<i>S. sonnei</i> 635 und 866 <sup>3</sup> , K12 (DH5α, C600)  Garcia-Aljaro <i>et al.</i> (2006)

Erläuterungen:

**AW** Antimikrobieller Wirkstoff; **CPX** Ciprofloxacin; **D** Deutschland; **DI** Diarrhö; **E** Erbrechen; **F** Fieber; **GB** Großbritannien;  
**HUS** Hämolytisch-urämisches Syndrom; **Induktion des lytischen Zyklus:** Es werden intakte Phagenpartikel induziert; **Induktion der Stx-Produktion:** Die Stx-Produktion steigt an, ohne dass zwingend intakte lytische Phagen nachweisbar sind; **K12** *E. coli* K12; **M** Mensch; **MMC** Mitomycin C; **n. a.** nicht angegeben; **NFX** Norfloxacin; **Trp** Tryptophan; **UV** Bestrahlung mit UV-Licht.

<sup>1</sup> Induktion des lytischen Vermehrungszyklus; <sup>2</sup> Induktion der Stx-Produktion <sup>3</sup> Bei den gekennzeichneten Stämmen handelt es sich nicht um *E. coli*-Stämme, sie werden jedoch zur Vereinfachung ebenfalls in der betreffenden Spalte mit aufgeführt.

\* Bei dem Stamm handelt es sich um einen enteroaggregativen hämorrhagischen *E. coli*-Stamm (EAHEC).

† Die Bezeichnung folgt der Nomenklatur von Calderwood *et al.* (1996), da weder die Nukleotidsequenz des *stx*-Gens noch ein Subtypisierungsergebnis publiziert ist.



### 2.3 Regulation der Stx-Bildung

Die regulierte Expression eines Gens bezeichnet im Gegensatz zur konstitutiven (ständigen) Expression die hinsichtlich der Menge von der Zelle gesteuerte Synthese eines Genproduktes. Meist ist die Regulation der Genexpression eine Reaktion der Zelle auf bestimmte extrinsische oder intrinsische Signale. Die wenigsten bakteriellen Gene werden konstitutiv exprimiert (Knippers 2006).

Die Stx-Produktion, d. h. die Menge an gebildetem Stx, wird zum einen auf der Ebene der Transkription kontrolliert. Die  $A_1B_5$ -Stöchiometrie im Stx-Holotoxinmolekül ist allerdings die Folge der unterschiedlich effizienten Translation der *stxA*- und *stxB*-mRNA. Die unterschiedlichen Mengen, in denen StxA und StxB gebildet werden, sind dabei das Resultat der verschiedenen starken Affinitäten der Ribosomenbindungsstellen (RBS) in der *stxA*- und *stxB*-mRNA, nicht aber einer unterschiedlich starken Transkription der beiden Gene (Weinstein *et al.* 1988b, Weinstein *et al.* 1989, Sung *et al.* 1990). So waren bei STEC-Stämmen der Stx-Subtypen Stx2c, Stx2d und Stx2e (hier: Nomenklatur nach Calderwood *et al.*) die *stxA*- und *stxB*-mRNA-Level im jeweiligen Stamm gleich hoch (Zhang *et al.* 2005). Für Stx bzw. bei Stx1a ist experimentell belegt, dass die Translation der Gene für die A- und die B-Untereinheiten an jeweils eigenen RBS beginnen und dass die RBS der *stxB*-mRNA effizienter ist als diejenige der *stxA*-mRNA (Strockbine *et al.* 1988, Habib und Jackson 1993). Auch im Stx2e-Operon agieren zwei voneinander unabhängige RBS jeweils stromaufwärts von *stxA*<sub>2e</sub> und *stxB*<sub>2e</sub> (Weinstein *et al.* 1988b).

Stromaufwärts von *stxA* bzw. *stxA*<sub>1a</sub> befindet sich eine identische, phagenunabhängige, Eisen-regulierte Promotorsequenz (Calderwood *et al.* 1987, Calderwood und Mekalanos 1987, De Grandis *et al.* 1987, Strockbine *et al.* 1988). Entsprechende Promotorsequenzen, welche jedoch nicht durch den Eisengehalt im Medium beeinflusst werden, wurden auch stromaufwärts (-35 und -10) von *stxA*<sub>2a</sub> und *stxA*<sub>2e</sub> gefunden (Weinstein *et al.* 1988b, Sung *et al.* 1990). Diese Sequenzen sind bei Stx2a und Stx2e identisch (Sung *et al.* 1990). In welchem Umfang jener - nicht phagenkodierte - Promotor an der Transkription von Stx2a bzw. Stx2e beteiligt ist, wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird die Transkriptionseffizienz des phagenunabhängigen *stx*<sub>2a</sub>/*stx*<sub>2e</sub>-Promotors *pStx2a/Stx2e* als gleichwertig beschrieben mit derjenigen des *stx/stx*<sub>1a</sub>-Promotors *pStx/Stx1a* im Eisenmangelzustand (Sung *et al.* 1990). Dieser Beobachtung widerspricht jedoch eine andere Studie, in der *stx*<sub>2</sub> (hier: Nomenklatur nach Calderwood *et al.*) aus dem EHEC-Stamm „1:361“ nur vom noch weiter stromaufwärts gelegenen, späten Phagenpromotor *p<sub>R</sub>* transkribiert wurde. Der eigene Promotor *pStx2* (hier: Nomenklatur nach Calderwood *et al.*) im Vergleich dazu war funktional nahezu unbedeutend (Wagner *et al.* 2001a). Anders als *pStx/Stx1a* besitzt der Promotor *pStx2a/Stx2e* keine

Bindungsstelle für das Fur-Repressorprotein, weshalb seine Aktivität vom Eisengehalt im Medium nicht abhängt (Sung *et al.* 1990).

Stromaufwärts von *stxA*<sub>2c</sub> befindet sich ebenfalls eine Promotorsequenz (Schmitt *et al.* 1991). Oberhalb des 5'-Endes von *stxA*<sub>2f</sub> wurde zwar ebenfalls eine Promotorsequenz gefunden, sie war aber nur zu 38,3 % homolog zu der Sequenz des Promotors *pStx2a/Stx2e* (Gannon *et al.* 1990). Vor dem Gen der B-Untereinheit von Stx2a befindet sich kein eigener Promotor (Sung *et al.* 1990). Vor den Genen der B-Untereinheiten von Stx und Stx1a wurde dagegen eine eigene Promotorsequenz identifiziert (Huang *et al.* 1986, De Grandis *et al.* 1987, Jackson *et al.* 1987b, Habib und Jackson 1992). Dieser Promotor ist nicht durch Eisen reguliert und besitzt eine 6-fach geringere Transkriptionseffizienz als der vor den *stxA*-Genen gelegene Promotor *pStx/Stx1a* (Habib und Jackson 1992). Obwohl eine eigene Promotorsequenz stromaufwärts von *stxB/stxB*<sub>1a</sub> existiert, ist davon auszugehen, dass die Transkription sowohl von *stxA/stxA*<sub>1a</sub> als auch von *stxB/stxB*<sub>1a</sub> polycistronisch vom *pStx/Stx1a*-Promotor ausgeht (Huang *et al.* 1986, De Grandis *et al.* 1987, Jackson *et al.* 1987b).

Bisher sind hauptsächlich zwei Mechanismen bekannt, über welche die Stx-Bildung in STEC-Stämmen stimuliert wird:

1. Induktion des jeweiligen Stx-konvertierenden-Bakteriophagen (siehe 2.3.1)
2. Induktion der Stx/Stx1-Expression durch Eisenmangel, vermittelt über den *fur*-Lokus (siehe 2.3.2)

### 2.3.1 Induktion Stx-konvertierender Bakteriophagen

Da sich die Stx-Gene im Genom von Prophagen befinden, ist ihre Expression an den Phagenreplikationszyklus und die damit verbundenen Mechanismen der Genregulation gekoppelt (Wagner *et al.* 2001a). Ihre Lage stromabwärts des Phagengens Q bedingt, dass sie wie die anderen Phagengene dieser Region reguliert und erst bei der Induktion des Prophagen transkribiert werden (Wagner *et al.* 1999, Wagner *et al.* 2001a, Wagner und Waldor 2002). Die phagenabhängige Transkriptionsregulation spielt nach heutiger Ansicht die größte Rolle für die Stx-Produktion eines STEC-Stammes (Schmidt 2001, Wagner *et al.* 2001a). Die Stärke der Stx-Produktion ist stark korreliert mit dem Grad der Phageninduktion (Fuchs *et al.* 1999). Als Induktion wird der Übertritt des Phagen von der Lysogenie in den lytischen Zyklus verstanden (Koudelka *et al.* 2004). Aufgrund der Position des *stx*-Operons hinter dem 3'-Ende des Antiterminators Q und vor dem 5'-Ende der Lysogene S und R können *stxA* und *stxB* vom späten Promotor *p<sub>R</sub>* am Transkriptionsterminator *t<sub>R</sub>* vorbei abgelesen werden, sobald der Phagenrepressor Ci seine Wirkung verliert. Dadurch nimmt zum einen die Menge an Stx zu, und sollte das Phagengenom intakt sein, kommt es zum anderen zur Produktion infektiöser Phagenpartikel (Muniesa *et al.* 2003). Das beschriebene Regulationsprinzip trifft

bis zu einem gewissen Grad auch auf replikationsdefiziente Prophagen zu, d. h. die Stx-Produktion kann unter dem Einfluss eines Phageninduktors auch in solchen STEC-Stämmen ansteigen, in denen parallel keine infektiösen Phagenpartikel entstehen (Muniesa *et al.* 2000, Beutin *et al.* 2008). Deshalb wurde umgekehrt aus der Beobachtung, dass beim Induktionsversuch mit Mitomycin C (MMC) der Anstieg der *stxA*- und *stxB*-mRNA-Konzentrationen ausblieb, gefolgert, dass entsprechende Gene des Stx-tragenden Prophagen defekt seien oder fehlen (Zhang *et al.* 2005).

Die Induktion des Bakteriophagen wird in erster Linie durch DNS-schädigende Substanzen ausgelöst, z. B. durch MMC (Łoś *et al.* 2010). MMC reagiert mit den DNS-Molekülen der Bakterienzelle und schädigt diese, indem es durch bifunktionelle Alkylierung kovalente Bindungen in und zwischen den DNS-Einzelsträngen provoziert (Verweij und Pinedo 1990). Die DNS-Schäden lösen in der betroffenen Bakterienzelle den SOS-Reparaturmechanismus aus, der mit der Aktivierung der zellulären Protease RecA startet. Eine ähnliche Wirkung wie MMC haben Chinolon-Antibiotika. Diese Wirkstoffe hemmen die bakterielle Gyrase und lösen die SOS-Antwort über die Akkumulation von einzelsträngiger DNS aus (Matsushiro *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2000). Das aktivierte RecA spaltet nicht nur sein Substrat LexA, welches als Repressor der SOS-Gene fungiert, sondern stimuliert auch die Autoproteolyse des Phagen-Repressors CI, der im Stadium der Lysogenie die Transkription aller anderen Phagengene unterdrückt (Rozanov *et al.* 1998, Koudelka *et al.* 2004). Die Proteolyse des Repressors CI erfolgt an den Aminosäuremotiven Ala-Gly und Cys-Gly, beim Phagen 933W jedoch an dem Motiv Leu-Gly (Koudelka *et al.* 2004). Die RecA-abhängige Phageninduktion kurbelt bei entsprechenden Prophagen auch die Stx-Produktion an. So bilden *recA*-defiziente Mutanten der EHEC-Stämme EDL 933 und 86-24 signifikant weniger Stx2a bzw. Stx2 als ihre Elternstämme mit intaktem *recA*-Gen. Zusätzlich verbleibt Stx in diesen Mutanten überwiegend in der Bakterienzelle und kann, anders als bei den Ursprungsstämmen, nicht mehr im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Mühldorfer *et al.* 1996, Fuchs *et al.* 1999). Erst die Komplementierung mit *recA* rekonstituiert wieder die höhere Stx2a- bzw. Stx2-Produktion und -Freisetzung. Intakte, Stx2-konvertierende Phagenpartikel werden ebenfalls nur in den *recA*-positiven bzw. -komplementierten Stämmen *E. coli* 86-24 bzw. *E. coli* C600(φ86-24) gebildet (Fuchs *et al.* 1999). Möglicherweise spielen auch Polyamine eine Rolle bei der RecA-vermittelten SOS-Antwort. Denn die SOS-Antwort, ausgelöst durch MMC, UV- oder γ-Strahlen, ist in Stämmen, die unfähig sind, Polyamine zu synthetisieren, schwächer als wenn diese Stämme mit Polyaminen, z. B. Putrescin oder Spermidin, supplementiert werden (Kim und Oh 2000).

Der Anstieg der Stx-Menge nach der Phageninduktion ist durch mehrere Faktoren verursacht: Erstens steigt die Anzahl der *stx*-Genkopien durch die Vervielfältigung des Phagen-genoms

an. Zusätzlich ermöglicht der Antiterminator Q die verstärkte Transkription von *stx* vorbei am Terminator  $t_R$ , wodurch die Anzahl *stx*-spezifischer mRNA-Moleküle ansteigt (Strauch *et al.* 2008). Untersuchungen von Wagner *et al.* (1999) machten deutlich, wie stark der Regulationsmechanismus des jeweiligen lambdoiden Prophagen die Stx-Bildung beeinflusst: Lysogene, bei denen der lysogenisierende Phage variierte, das Wirtsbakterium jedoch stets der gleiche *E. coli*-K12-Stamm MC1.000 war, waren unterschiedlich starke Stx2-Bildner. Die Koinfektion eines *E. coli*-Stammes mit mehreren Stx-konvertierenden Bakteriophagen kann zu einer insgesamt schwächeren Stx-Produktion führen, als es bei einem Lysogen mit nur einem einzigen *stx*-tragenden Prophagen der Fall ist (Serra-Moreno *et al.* 2008).

### 2.3.2 Weitere Mechanismen zur Regulation der Stx-Produktion

#### Eisen-abhängige Regulation des Stx/Stx1a-Operons

Der phagenunabhängige Promotor *pStx/pStx1a* (siehe oben) wird durch die Eisenkonzentration im Kulturmedium reguliert, genauer durch die Konzentration an zweiwertigen Eisenionen. Diese Regulation ist durch den *fur*-Lokus (engl. für „*ferric uptake regulation*“) vermittelt, dessen Genprodukt, das Fur-Protein, als Repressor an Operatorsequenzen im Promotorbereich von *stxA* und *stxA<sub>1a</sub>* bindet (Calderwood *et al.* 1987, Calderwood und Mekalanos 1987, De Grandis *et al.* 1987, Calderwood und Mekalanos 1988, Strockbine *et al.* 1988). Beim Fur-Operator handelt es sich um eine 21 Basen große Region mit Dyaden-Symmetrie. Die Bindung von Fur an diese Region ist aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie zu den Bindungsstellen regulativer Proteine des bakteriellen Fe-Haushalts möglich. So ist die entsprechende Region des Stx1a-Operons beim Phagen H-19B zu 68 % homolog zur korrespondierenden Promotorregion des *iucA*-Gens, welches für das Siderophor Aerobactin kodiert (De Grandis *et al.* 1987). Das zweiwertige Eisenion fungiert dabei als Korepressor, so dass das Fur-Protein nur dann in der Lage ist, an die DNS zu binden, wenn es mit einem  $Fe^{2+}$ -Ion beladen ist (Althaus *et al.* 1999). Bei Eisenmangel kommt es zur Derepression, da der Fur-Repressor, ein Zink-Metalloprotein, von der Operator-DNS dissoziiert, sobald er sein Eisenion abgibt. Unter diesen Umständen können die stromabwärts befindlichen Gene transkribiert werden - entweder das Strukturgen für ein Eisen-Aufnahmesystem oder, im Fall von *pStx/Stx1a*, das *stxA* bzw. *stxA<sub>1a</sub>* und das *stxB* bzw. *stxB<sub>1a</sub>* (Althaus *et al.* 1999). Im Gegensatz zu Stx und Stx1a, deren Stx-Produktion durch Eisendepletion bei der Anzucht der betreffenden Stämme um ein Vielfaches gesteigert werden kann (Weinstein *et al.* 1988a), ist das Stx2-Operon nicht Eisen-reguliert, ebensowenig das des Subtyps Stx2e. Die Inkubation der Stämme „412“ und „TB1(pCG6)“ in Eisen-depletiertem Syncase-Medium vermochte deshalb die Stx2e-Menge nicht zu steigern (MacLeod und Gyles 1989). Auch das porcine EDEC-Isolat „S1191“ reagierte auf eine

Eisendepletion nicht mit einem Anstieg des zellassoziierten oder extrazellulären Stx2e (Weinstein *et al.* 1988b).

### Seltene tRNA-Gene

Ungeklärt ist bislang, ob sog. seltene tRNA-Gene einen Einfluss auf die Expression des *stx*-Operons ausüben können. Stromaufwärts des *stxA<sub>2</sub>*-Gens wurde bei 5 von 10 EHEC-Stämmen, welche ausschließlich Stx vom Typ Stx2 produzierten, die Sequenz für *ileX* nachgewiesen, während diese Gensequenz bei keinem der 11 untersuchten ausschließlich Stx1-produzierenden EHEC-Stämme zu finden war (Schmidt *et al.* 1997). Gleichzeitig war das Kodon AUA, welches für die Aminosäure Isoleucin (Ile) kodiert, im *stx<sub>2</sub>*-Gen fast doppelt so häufig vorhanden wie im *stx<sub>1</sub>*-Gen. Die durch *ileX* kodierte tRNA ist in der Lage, genau diese Aminosäure, Isoleucin, zu binden und während der Translation in das entstehende Polypeptid einzubauen. Daher hielten die Untersucher es für möglich, dass der Gehalt des *stx<sub>2</sub>*-Operons an AUA-Kodons Einfluss auf die Expression des Operons nimmt. In einer anderen Untersuchung wurde bei verschiedenen STEC-Stämmen vor dem Operon von Stx2-Subtypen die Gensequenz für eine Arginin-bindende tRNA nachgewiesen. Deren Antikodon erkennt ein Kodon, welches bei *E. coli* üblicherweise nur selten vorkommt, bei den untersuchten STEC-Stämmen jedoch sehr häufig in deren *stxA<sub>2</sub>*-Gen vertreten war (Kanho und Inokuchi 1999). Beutin und Kollegen stellten bei STEC-2e-Stämmen dagegen fest, dass diese sich trotz des Vorkommens identischer tRNA-Gene stromaufwärts von *stxA<sub>2e</sub>* erheblich in der Höhe der von ihnen gebildeten Stx2e-Menge unterschieden (Beutin *et al.* 2008). Außerdem bildeten gerade jene 15 Stämme, die sich genetisch in der Region stromaufwärts von *stxA<sub>2e</sub>* deutlich von der Region mit den konservierten tRNA-Genen des Phagen-Prototypen ΦP27 aus dem Stamm *E. coli* 2771/97 unterschieden, besonders große Mengen an Stx2e. Daher folgerten die Autoren, dass die nachgewiesenen tRNA-Gene nicht essentiell für eine effektive Stx2e-Produktion sind.

## 2.4 Einfluss exogener Faktoren auf die Stx-Bildung und/oder -Freisetzung bei STEC

STEC-Stämme variieren in der von ihnen gebildeten und/oder freigesetzten Stx-Menge (Paton und Paton 1998). Dabei kann die Stx-Menge, die ein Stamm *in vivo* bildet, den Schweregrad und den Verlauf der STEC-Infektion beeinflussen (Paton und Paton 1998). Allerdings sind Unterschiede in der Virulenz nicht nur abhängig von der Stx-Bildungskapazität eines Isolats, sondern auch vom Stx-Typ und -Subtyp *per se*. So ist das Auftreten von Hämorrhagischer Kolitis und/oder HUS beim Menschen gehäuft mit dem Nachweis von Stämmen assoziiert, welche einen Stx2-Subtyp produzieren, insbesondere Stx2a, Stx2c oder

Stx2d (Ostroff *et al.* 1989, Boerlin *et al.* 1999, Friedrich *et al.* 2002, Bielaszewska *et al.* 2006, Orth *et al.* 2007, Persson *et al.* 2007, Kawano *et al.* 2008). Und auch im Mausmodell ist die LD<sub>50</sub> von Stx1a 400-fach höher als die von Stx2a, obwohl die Affinität für den Rezeptor Gb3 bei Stx1a stärker ist als bei Stx2a (Tesh *et al.* 1993). Bei der Suche nach Faktoren, welche die Stx-Bildung von STEC-Stämmen beeinflussen können, standen bisher verschiedene Parameter der kulturell-bakteriologischen Anzucht (Temperatur, pH, O<sub>2</sub>-Konzentration und verschiedene Nährstoffe) sowie verschiedene physikalische, biologische und chemische Größen im Mittelpunkt. Wegen der großen klinischen Bedeutung wurden antimikrobielle Chemotherapeutika (Antiinfektiva) besonders häufig hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Stx-Bildung von STEC- bzw. EHEC-Stämmen untersucht.

### Anzuchtbedingungen

Der Einfluss von Anzuchtbedingungen (Anzuchtdauer, Eisengehalt, Nährmedium, Nährstoffe, Anzuchttemperatur, pH-Wert, Schüttelinkubation, O<sub>2</sub>-Gehalt, Vermehrungsphase) auf die Stx2e-Bildung wurde umfassend erstmals 1989 untersucht (MacLeod und Gyles 1989). Allerdings wurde nur ein porciner EDEC-Stamm (Stamm „412“) sowie eine *E. coli*-K12-Transformante, die das *stx<sub>2e</sub>*-Gen von Stamm „412“ enthielt, untersucht. Dabei wurden die höchsten Stx2e-Mengen nach 20- bis 24-stündiger Inkubationszeit erzielt. Die Anzucht in Syncase-Medium führte zu den höchsten Stx2e-Titern. Die Depletion von Eisen hatte keinen steigernden Effekt. Die Zugabe von Kohlenhydraten (Gluconsäure, Arabinose, Galaktose, Saccharose und Laktose) oder der Aminosäure Glyzin hatte ebenfalls keinen Einfluss auf den Stx2e-Titer. Auch das Angebot von 20 linksdrehenden Aminosäuren erhöhte die Stx2e-Produktion des EDEC-Stammes „412“ nicht. Mit Glukose-Zusatz lagen die Stx2e-Titer jedoch sowohl beim Wildtyp als auch bei der Transformante doppelt so hoch wie ohne. Die folgenden Inkubationstemperaturen wurden ebenfalls auf ihren Einfluss geprüft: 18 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C und 42 °C. Die signifikant höchsten Stx2e-Titer wurden bei beiden Stämmen bei 37 °C erreicht. Bei 30 °C waren die Stx2e-Titer höher als bei 42 °C. Der Einfluss des pH-Wertes wurde in Syncase-Medium bestimmt, wobei das Medium zum Zeitpunkt der Beimpfung auf pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 oder 9,0 eingestellt worden war. Nur bei der Transformante wurde die Stx2e-Menge durch den pH-Wert beeinflusst und war zwischen pH 8,0 und pH 8,5 am höchsten. Die aerobe Inkubation ergab im Vergleich zur anaeroben Kultivierung geringgradig höhere Stx2e-Titer. Außerdem war die Schüttelkultur bei beiden Stämmen der statischen Inkubation hinsichtlich der gebildeten Stx2e-Menge überlegen. Bei dem EHEC-Stamm O157:H7 Sakai wurde ein deutlicher Anstieg der Stx1a- und Stx2a-Expression beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase verzeichnet (Bergholz *et al.* 2007). In einer anderen Untersuchung wurde die Stx2a-Promo-

toraktivität bei *E. coli*-Stämmen gemessen, welche zuvor mit dem Plasmid pADR-28 transformiert worden waren. In diesem Plasmid waren der proximale Abschnitt des *stxA<sub>2a</sub>*-Gens inklusive dessen Promotorregion mit dem *phoA*, dem Gen der bakteriellen alkalischen Phosphatase, rekombiniert worden. Somit spiegelte die Aktivität von PhoA in diesen Mutanten die Expression des *stxA<sub>2a</sub>*-Gens wider. Bei dem *E. coli*-Stamm CC118(pADR-28) hatten Unterschiede in der Sauerstoffspannung (aerobe, mikroaerophile oder anaerobe Anzucht), die Variation des pH-Wertes (pH 6,5 bis 8,5) im Medium sowie der Gehalt des Anzuchtmediums an Azetaten (25 bis 100 mM Na-Azetat), Glukose, Saccharose, Laktose oder Glyzin keinen Einfluss auf die Aktivität von PhoA und somit auf die *stxA<sub>2a</sub>*-Expression (Mühldorfer *et al.* 1996). Die Anzuchttemperatur hatte dagegen einen Effekt, welcher jedoch nur dann auftrat, wenn gleichzeitig das Gen *hns*, welches das DNS-bindende, reprimierende Protein H-NS kodiert, fehlte. Bei dem *hns*-negativen Stamm *E. coli* HMG5(pADR-28) war nämlich die Aktivität von PhoA bei allen gemessenen Temperaturen (30 °C, 37 °C und 42 °C) größer als bei dem *hns*-positiven Stamm *E. coli* MC1029(pADR-28). Bei dem *hns*-negativen Stamm war die PhoA-Menge und damit die *stxA<sub>2a</sub>*-Expression bei 30 °C deutlich stärker als bei 37 ° oder bei 42 °C. Die Osmolarität des Mediums hatte dagegen keinerlei Einfluss auf die PhoA-Expression.

### Medienzusätze, sonstige Behandlung

Neben der Auswirkung verschiedener Anzuchtbedingungen auf die Stx-Produktion und/oder -Freisetzung werden zunehmend auch die Effekte anderer Stressoren überprüft. So verstärkte die Koinkubation des EHEC-Stammes *E. coli* 1:361 (O157:H7) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder mit humanen neutrophilen Granulozyten, welche in der Lage sind, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freizusetzen, die Stx2-Produktion (Wagner *et al.* 2001b). Dabei ließ die Zugabe von 0,25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Kultur von *E. coli* 1:361 die Stx2-Konzentration im Kulturlysate ansteigen. Die Kokultivierung von *E. coli* 1:361 mit 10<sup>6</sup> humanen neutrophilen Granulozyten resultierte in einer ca. 4-fach höheren Stx2-Konzentration als ohne Granulozyten.

Yamamoto *et al.* (2003) bestrahlten Kulturen der STEC-Stämme OB1 (O157:H7, *stx<sub>2</sub><sup>+</sup>*) und 1076 (O86:H-, *stx<sub>2</sub><sup>+</sup>*) mit dem Kobalt-Isotop <sup>60</sup>Co. Dosen von 0,1 bis 0,3 kGy bewirkten dabei einen Anstieg der Stx2-Konzentration im Ultraschall-Lysatüberstand der Gesamtkultur, verglichen mit der Stx2-Konzentration der nicht bestrahlten Kultur.

In der **Tabelle 3** sind die Einflüsse verschiedener Anzuchtbedingungen und Medienzusätze auf die Stx-Transkription bzw. -Produktion und/oder -Freisetzung zusammengestellt.

Tabelle 3: Einfluss verschiedener Medienzusätze und Anzuchtbedingungen auf die Stx-Transkription bzw. Stx-Produktion und/oder -Freisetzung

Parameter	Dosis	Stx- Typ(en)	<i>E. coli</i> -Stamm/ Herkunft	Auswirkung auf die Stx-Produktion/ -Freisetzung	Stx-Quantifi- zierung	Inkubations- bedingungen	Referenz
Variation der Anzuchtbedingungen							
Eisessig	pH 4,0 bis 5,4	Stx2a	EDL 933 (O157:H7; stx <sub>1a</sub> <sup>+</sup> , stx <sub>2a</sub> <sup>+</sup> )	Abnahme der stx <sub>2a</sub> -Transkription bei pH-Werten zwischen 4,4 und 5,0	real time-RT-PCR für stx <sub>2a</sub>	LBM:mMRS (9:1)	Carey <i>et al.</i> (2008)
Essigsäure, Milchsäure, Salzsäure	2,5 mM, 5 mM, 10 mM	Stx2a	EDL 933 (O157:H7; stx <sub>1a</sub> <sup>+</sup> , stx <sub>2a</sub> <sup>+</sup> )	Abnahme der stx <sub>2a</sub> -Transkription mit zunehmender Säurekonzentration	real time-RT-PCR für stx <sub>2a</sub>	2 h, LBM:mMRS (9:1)	Carey <i>et al.</i> (2008)
Fe-Mangel (Syncase-Medium)	entfällt	Stx1	HUS, Mr. 6 STEC-1; Rinderweiden: 13 STEC-1, 7 STEC-1c	Anstieg von Stx1 bei 6 HUS-Stämmen und von Stx1/Stx1c bei 13 Rinder-assoziierten STEC	ELISA	3 h, 37 °C	Ritchie <i>et al.</i> (2003)
NaCl	200 mM	Stx2 (ersetzt durch Gfp)	<i>E. coli</i> /86-24 (O157:H7)	kein Effekt	ELISA, Western Blot	6 h, 37 °C, LBM sowie Minimal-Medium mit Glukose	Łoś <i>et al.</i> (2010)
NaCl	1 %, 2 %, 3 %	Stx2a	<i>E. coli</i> /86-24 (stx <sub>2a</sub> <sup>+</sup> ), EDL 933 (stx <sub>1a</sub> <sup>+</sup> , stx <sub>2a</sub> <sup>+</sup> )	Anstieg von freiem sowie von zell-assoziiertem Stx2A bzw. von Stx2A-spezifischer mRNA bei 2 % NaCl	Western Blot (Stx2A) und real time-RT-PCR (Stx2A-spezifische mRNA)	6 h, 37 °C, 150 rpm, LBM mit/ohne NaCl-Zusatz	Harris <i>et al.</i> (2012)
Säurestress	pH 3 sowie pH 5	Stx2	<i>E. coli</i> /86-24 (O157:H7)	kein Effekt	Vero-ZT	15 bzw. 30 min, DMEM-Medium (pH 3) mit/ohne Adaption in DMEM-Medium (pH 5), 1 h, 37 °C	House <i>et al.</i> (2009)

Fortsetzung der Tabelle 3 auf der nächsten Seite



Parameter	Dosis	Stx- Typ(en)	<i>E. coli</i> -Stamm/ Herkunft	Auswirkung auf die Stx-Produktion/ -Freisetzung	Stx-Quantifi- zierung	Inkubations- bedingungen	Referenz
<b>Biologisch</b>							
humane neutrophile Granulozyten	1 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml	Stx2	1:361 sowie 1:361ΔQ-R <sub>R</sub> '	Anstieg von Stx2 bei 1:361	ELISA	ÜNK in L-M, anschlie- ßend Verdünnung 1:5.000 in L-M sowie HBSS	Wagner <i>et al.</i> (2001b)
NO (NO- Donor NOR-4)	200 µM	Stx2a	EDL 933 (O157:H7; stx <sub>1a</sub> <sup>+</sup> , stx <sub>2a</sub> <sup>+</sup> )	Verringerung der stx <sub>2a</sub> - mRNA, Inhibition der Stx2a-Produktion, Verringerung der Stx2a-Phagen-Frei- setzung +/- MMC	mRNA: real time-RT-PCR Stx2a: ELISA Stx2a-Phagen: EIMf, PCR; real time-PCR	Prä-Inkubation mit NOR-4 (6 h), mit/ohne MMC-Zugabe (f. c. 200 ng/ml) nach 6 h, weitere Inkubation für 18 h, 37 °C	Vareille <i>et al.</i> (2007)
Probiotika: <i>Lactobacillus</i> spp. (n = 7), <i>Pedococcus</i> spp. (n = 3), <i>Bifidobac- terium</i> spp. (n = 4)	5 ml Kultur jedes Pro- biotikums, OD <sub>600</sub> = 0,8	Stx2a	EDL 933 (O157:H7; stx <sub>1a</sub> <sup>+</sup> , stx <sub>2a</sub> <sup>+</sup> )	Abnahme der stx <sub>2a</sub> - mRNA am stärksten bei <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>B. thermophilum</i> und <i>P. pentosaceus</i>	real time-RT-PCR für stx <sub>2a</sub>	2 h, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , LBM:mMRS (9:1)	Carey <i>et al.</i> (2008)
<b>Chemisch</b>							
α-Methoxy- phenol	0,001 %, 0,01 %, 0,1 %	Stx1, Stx2 bzw. Stx1a, Stx2a	1. ATCC 43889 (stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> ) 2. ATCC 43890 (stx <sub>1</sub> <sup>+</sup> ) 3. ATCC 43895 (stx <sub>1a</sub> <sup>+</sup> , stx <sub>2a</sub> <sup>+</sup> )	Abnahme von Stx1 und Stx2 bzw. von Stx1a und Stx2a bei 0,1 % bei allen 3 Stämmen	RPLA	24 h, 37 °C, CAYE- Bouillon	Sakagami <i>et al.</i> (1999)

Fortsetzung der **Tabelle 3** auf der nächsten Seite

Parameter	Dosis	Stx-Typ(en)	E. coli-Stamm/ Herkunft	Auswirkung auf die Stx-Produktion/ -Freisetzung	Stx-Quantifi- zierung	Inkubations- bedingungen	Referenz
<b>Chemisch</b>							
Epigallo- katechin, Epikatechin, Epikatechin- gallat, Katechin	50, 100, 200, 250, 500 µg/ml	Stx1, Stx2	EHEC-Stamm 212 (M. Sakai, Japan, 1996)	Kein Effekt auf Stx1/Stx2 im K-Üst	RPLA	24 h, 37 °C, statische Kultur	Sugita- Konishi <i>et</i> <i>al.</i> (1999)
Epigallo- katechingallat	50, 100, 200, 250, 500 µg/ml	Stx1, Stx2	EHEC-Stamm 212 (M. Sakai, Japan, 1996)	Abnahme von Stx1/Stx2 im K-Üst <sup>1</sup> , Anstieg von zellass. Stx1 <sup>1</sup> , kein Effekt auf zellass. Stx2 <sup>1</sup> ; Abnahme von Stx1/Stx2 im K-Üst <sup>2</sup> , Anstieg von zellass. Stx1/Stx2 <sup>2</sup>	RPLA <sup>1</sup> , Vero-ZIT <sup>2</sup>	24 h, 37 °C, statische Kultur	Sugita- Konishi <i>et</i> <i>al.</i> (1999)
Gallokatechin- gallat	50, 100, 200, 250, 500 µg/ml	Stx1, Stx2	EHEC-Stamm 212 (M. Sakai, Japan, 1996)	Abnahme von Stx1/Stx2 im K-Üst <sup>1</sup> , Anstieg von zellass. Stx1 <sup>1</sup> , kein Effekt auf zellass. Stx2 <sup>1</sup> ; Abnahme von Stx1/Stx2 im K-Üst <sup>2</sup> , Anstieg von zellass. Stx1/Stx2 <sup>2</sup>	RPLA <sup>1</sup> , Vero-ZIT <sup>2</sup>	24 h, 37 °C, statische Kultur	Sugita- Konishi <i>et</i> <i>al.</i> (1999)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 mM	Stx2 (ersetzt durch Gfp)	E. coli 86-24 (O157:H7)	Anstieg der Expression*	ELISA, Western Blot	6 h, 37 °C, LBM sowie Minimal-Medium mit Glukose	Loś <i>et al.</i> (2010)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,25 mM	Stx2	1:361 sowie 1:361ΔQ-P <sub>R</sub> '	Anstieg von Stx2*	ELISA	UNK in L-M, anschließend Verdünnung 1:5.000 in L-M	Wagner <i>et</i> <i>al.</i> (2001b)

Fortsetzung der **Tabelle 3** auf der nächsten Seite

Parameter	Dosis	Stx- Typ(en)	E. coli-Stamm/ Herkunft	Auswirkung auf die Stx-Produktion/ -Freisetzung	Stx-Quanti- fizierung	Inkubations- bedingungen	Referenz
<b>Chemisch</b>							
Kreosot	0,001, 0,01, 0,1 %	Stx1, Stx2 bzw. Stx1a, Stx2a	1. ATCC 43889 ( <i>stx<sub>2</sub></i> <sup>+</sup> ) 2. ATCC 43890 ( <i>stx<sub>1</sub></i> <sup>+</sup> ) 3. ATCC 43895 ( <i>stx<sub>1a</sub></i> <sup>+</sup> , <i>stx<sub>2a</sub></i> <sup>+</sup> )	Abnahme von Stx1/Stx2 im K-Üst bei 0,1 %, von Stx2a bei 0,1 % und von Stx1a bei 0,001 %	RPLA	24 h, 37 °C, CAYE- Bouillon	Sakagami <i>et al.</i> (1999)
NaNO <sub>2</sub>	100 % MHK (6 g/l)	Stx1, Stx2	EHEC O157:H7: FEC-43, FEC-83 ( <i>stx<sub>1</sub></i> <sup>+</sup> , <i>stx<sub>2</sub></i> <sup>+</sup> ), FEC-70 ( <i>stx<sub>2</sub></i> <sup>+</sup> )	kein Effekt	RPLA	30 min, 37 °C	Morita <i>et al.</i> (2004)
o-Ethylphenol	0,001, 0,01, 0,1 %	Stx1, Stx2 bzw. Stx1a, Stx2a	1. ATCC 43889 ( <i>stx<sub>2</sub></i> <sup>+</sup> ) 2. ATCC 43890 ( <i>stx<sub>1</sub></i> <sup>+</sup> ) 3. ATCC 43895 ( <i>stx<sub>1a</sub></i> <sup>+</sup> , <i>stx<sub>2a</sub></i> <sup>+</sup> )	Abnahme von Stx1 und Stx2 bzw. von Stx1a und Stx2a bei 0,1 % bei allen 3 Stämmen, bei 2. und 3. auch bei 0,01 %	RPLA	24 h, 37 °C, CAYE- Bouillon	Sakagami <i>et al.</i> (1999)
<b>Physikalisch</b>							
Bestrahlung mit <sup>60</sup> Co	0,1 bis 0,3 kGy	Stx2	OB1 (O157:H7), 1076 (O86:H+); M, Japan	Anstieg von Stx2	RPLA	2 h nach Bestrahlung, 37 °C, LBM, Schüttel- kultur	Yamamoto <i>et al.</i> (2003)

**Erläuterungen:** **CAYE** engl. *Casamino acid yeast extract*; **DMEM** engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; **EIMI** Elektronenmikroskop; **Fe** Eisen; **Gfp** engl. *green fluorescent protein*; **HBSS** engl. *Hanks buffered salt solution*, Hanks gepufferte Salzlösung; **HUS** Hämolytisch-urämisches Syndrom; **Kreosot** Kohlensteerdestillat (Phenolgemisch); **K-Üst** Kulturbedstand; **LBM** Luria-Bertani-Medium; **L-M** L-Medium; **M** Mensch; **MMC** Mitomycin C; **mmRS** modifiziertes Mann-Rogosa-Sharpe-Medium; **NaCl** Natriumchlorid; **NaNO<sub>2</sub>** Natriumnitrit; **NO** Stickstoffmonoxid; **NOR-4** (±)-(E)-4-ethyl-2-[(Z)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexen-1-yl-nicotinamid; **RPLA** reverse passive Latexagglutination; **RT** Reverse Transkriptase; **ÜNK** Über-Nacht-Kultur; **Vero-ZT** Verozell-Zytotoxizitätstest; **zell-ass.** zellassoziiertes Stx

\* Induktion infektiöser Phagenpartikel

## Antiiinfektiva

Die therapeutische Gabe von antimikrobiell wirksamen Chemotherapeutika („Antibiotika“) bei STEC-Infektionen des Menschen führte häufig zur Verschlimmerung der Symptome, schlimmstenfalls zur Entwicklung von HUS (Carter *et al.* 1987, Pavia *et al.* 1990, Wong *et al.* 2000). Umgekehrt sind aber auch mildere Krankheitsverläufe nach frühzeitiger Antibiotika-Gabe bekannt (Martin *et al.* 1990). Der Einsatz von Antiiinfektiva zur Behandlung von STEC-Infektionen wird deshalb kontrovers diskutiert.

Nach den Ergebnissen mehrerer wissenschaftlicher Untersuchungen reagieren die STEC-Stämme *in vitro* nicht so einheitlich, dass eine allgemeingültige Aussage über den Effekt der antibakteriellen Chemotherapie auf die STEC-Infektion und die Stx-Produktion von STEC-Stämmen *in vivo* möglich wäre. Dabei scheinen einerseits die Eigenschaften des jeweils untersuchten Stammes, aber auch der Wirkmechanismus des eingesetzten Antiiinfektivums eine Rolle zu spielen (Ichinohe *et al.* 2009).

Antimikrobielle Substanzen, welche den DNS-Metabolismus des Bakteriums verändern und damit die bakterielle SOS-Antwort auslösen, stimulieren besonders häufig die Stx-Produktion (Kimmit *et al.* 2000, Köhler *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2000, McGannon *et al.* 2010). Dazu zählt auch das zytostatische Antibiotikum Mitomycin C (MMC) (Verweij und Pinedo 1990), dessen Effekt auf die Stx-Produktion in zahlreichen Studien untersucht wurde (Köhler *et al.* 2000, Muniesa *et al.* 2000, Ritchie *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2005, Beutin *et al.* 2008). Seine stimulierende Wirkung auf die Stx-Bildung war zunächst dadurch bekannt geworden, dass Patienten, welche dieses Medikament im Rahmen einer Tumorthherapie erhalten hatten, an HUS erkrankten (Lesesne *et al.* 1989). Heute wird MMC oft als Vergleichssubstanz in Stimulationsversuchen an STEC-Stämmen eingesetzt, da es bei stimulierbaren Stämmen regelmäßig zum Anstieg der Stx-Konzentration in der Kultur führt. Ritchie *et al.* (2003) untersuchten die Stx-Produktion bei 38 *stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub>*-kodierenden STEC von Menschen (n = 13) und Rindern (n = 25) sowie bei 26 *stx<sub>1</sub>/stx<sub>1c</sub>*-kodierenden STEC von Menschen (n = 6) und Rindern (n = 20) ohne und mit MMC. Nach dreistündiger Anzucht mit MMC (f. c. 0,2 µg/ml) waren bei den *stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub>*-kodierenden STEC alle 13 humanen STEC sowie mindestens 18 der 25 bovinen STEC induziert worden. Bei den *stx<sub>1</sub>/stx<sub>1c</sub>*-kodierenden Stämmen waren 2 von 6 humanen Stämmen durch MMC induzierbar, von den bovinen Stämmen wurden 9 induziert. Gemessen wurde jeweils der n-fache Anstieg des Gesamt-Stx2 bzw. -Stx1 im Kulturlysat mit einem ELISA. Auch bei STEC-2e-Stämmen kann MMC deren Stx-Produktion forcieren (Muniesa *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2005, Beutin *et al.* 2008). So berichten Beutin *et al.* (2008), dass sie die Stx2e-Produktion bei 109 von insgesamt 110 untersuchten STEC-2e-Stämmen, die aus unterschiedlichen Quellen isoliert worden waren, mit dem Mediumzusatz von MMC

(f. c. 50 ng/ml) steigern konnten. Dabei war die durch MMC angekurbelte Stx2e-Bildung bei den Isolaten vom Menschen stets stärker als bei den Isolaten vom Schwein. Der Anstieg der Stx2e-Konzentration in der Kultur wurde begleitet von einem Anstieg der *stxA<sub>2e</sub>*-Transkriptionsrate.

Bisher sind zahlreiche Wirkstoffklassen der Antiinfektiva auf ihre Auswirkungen auf die von STEC-Stämmen gebildete Stx-Menge geprüft worden. Die meisten Untersuchungen wurden dabei an humanen STEC-Stämmen vorgenommen. Aminoglykoside führten in subinhibitorischer Dosis bei einigen Stämmen zu einer Zunahme des Stx1- bzw. Stx2-Gehaltes im Kulturüberstand. Am häufigsten blieb der Stx-Gehalt aber unbeeinflusst oder nahm sogar ab. So stieg die Stx1/Stx2-Konzentration nur bei insgesamt 13 von 40 STEC-Stämmen (32,5 %), welche in 5 verschiedenen Studien untersucht worden waren, an, während sie bei den restlichen Stämmen unverändert blieb oder sogar abnahm (Yoh *et al.* 1997, Grif *et al.* 1998, Morita *et al.* 2004, Pedersen *et al.* 2008, Mohsin *et al.* 2010). Die Auswirkung des Aminoglykosids Gentamicin wurde bisher scheinbar nur bei einem einzigen porcinen STEC-2e-Stamm untersucht. Die Stx2e-Konzentration in dessen Kulturüberstand blieb unbeeinflusst, wenn Gentamicin in subinhibitorischer Dosis eingesetzt wurde. Die Erhöhung der Dosis auf das 50-Fache der MHK führte dagegen zu einer Abnahme des zellassoziierten Stx2e (Uemura *et al.* 2004).

Der Einfluss von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auf die Stx-Konzentration von STEC-Stämmen humanen Ursprungs wurde anhand von Aminopenicillinen, Cephalosporinen, Penicillin G und Piperacillin/Tazobactam geprüft, wobei diese Wirkstoffe die Stx-Menge tendenziell eher ansteigen ließen. In fünf verschiedenen Studien wurde der Effekt des Aminopenicillins Ampicillin auf die Stx-Konzentration von insgesamt 12 humanen STEC-Stämmen ermittelt (Yoh *et al.* 1997, Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000, Morita *et al.* 2004, Mohsin *et al.* 2010). Dabei hatte Ampicillin bei 8 Stämmen einen stimulierenden Effekt auf die Stx1- oder Stx2-Bildung und/oder -Freisetzung, wenn subinhibitorische Dosen der Substanz eingesetzt wurden. Der Einfluss von Ampicillin auf die Stx2e-Konzentration wurde auch bei einem EDEC-Stamm überprüft (Uemura *et al.* 2004). Bei diesem Stamm führten sowohl subinhibitorische als auch inhibitorische Dosen zu einem Anstieg des Stx2e-Gehaltes im Kulturüberstand, während die Menge an zellassoziiertem Stx2e abnahm. Cephalosporine bewirkten, in Abhängigkeit vom untersuchten Stamm und der eingesetzten Substanz, entweder einen Anstieg oder eine Abnahme des Stx1- bzw. Stx2-Gehaltes der Kulturen (Walterspiel *et al.* 1992, Yoh *et al.* 1997, Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000, Murakami *et al.* 2000, Ichinohe *et al.* 2009, Mohsin *et al.* 2010). So nahm die Stx1- bzw. die Stx2-Menge unter dem Einfluss mindestens eines Cephalosporins bei 7 von insgesamt 16 Stämmen, die in 7 verschiedenen Studien untersucht worden waren, zu. Nur bei zwei STEC-Stämmen

konnte die Stx-Menge durch mehr als eines der verwendeten Cephalosporine gesteigert werden (Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000). Penicillin G und auch die Kombination Piperacillin/Tazobactam wurden nur in jeweils einer Studie untersucht. Dabei bewirkte Penicillin G bei 2 von 3 Stämmen einen Anstieg des Stx-Gehaltes im Kulturüberstand. Auch Piperacillin/Tazobactam führte bei dem Stamm PK552 zur gesteigerten Expression des Stx2-Operons (Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000).

Die Auswirkung von Sulfonamiden und/oder Trimethoprim auf die Stx-Produktion wurde besonders häufig geprüft. Trimethoprim ließ als Einzelsubstanz den Stx1- und/oder Stx2-Gehalt in der Kultur sowohl in subinhibitorischen Dosen als auch in inhibitorischen Wirkstoffkonzentrationen ansteigen (Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000). In ähnlicher Weise führte die Anzucht verschiedener STEC-Stämme humanen Ursprungs unter dem Einfluss von Sulfonamiden, meist in Kombination mit Trimethoprim, ebenfalls fast ausnahmslos zu einer Steigerung der Stx-Menge (Karch *et al.* 1986, Walterspiel *et al.* 1992, Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000). Die Kombination Sulfomethoxazol/Trimethoprim wurde auch an dem Stx2e-kodierenden *E. coli*-Stamm MVH 269 geprüft, der von einem Schwein mit Ödemkrankheit isoliert worden war. Ein Effekt war hier jedoch weder beim zellassozierten noch beim freien Stx2e zu beobachten (Uemura *et al.* 2004).

Der Einsatz von Antibiotika als Wachstumsförderer in der Tierproduktion war bis zum 31.01.2005 in Deutschland zulässig (EU-Parlament/-Rat 2003). Köhler *et al.* (2000) untersuchten deshalb den Einfluss solcher Wachstumsförderer auf die Stx2-Produktion von drei Stämmen humanen Ursprungs, nämlich durch das Ionophor-Antibiotikum Monensin sowie die Substanzen Carbadox und Olaquinox (Köhler *et al.* 2000). Bei allen drei Stämmen führte Monensin zur Reduktion der Stx2-Konzentration in den Kulturüberständen, während Carbadox und Olaquinox dagegen einen 27- bis 124-fachen Anstieg bewirkten.

Polypeptidantibiotika wie Polymyxin B und Polymyxin E (Colistin) werden in der Humanmedizin aufgrund ihrer Nephro- und Neurotoxizität bevorzugt zur topischen Therapie verwendet (Stahlmann 2001a). Daher gibt es kaum publizierte Daten über die Auswirkung dieser Wirkstoffe auf die Stx-Produktion. Immerhin verursachte Polymyxin B in der einzigen auffindbaren Studie an EHEC bei allen 3 untersuchten Stämmen einen Anstieg der Stx1- bzw. Stx2-Menge in den Kulturüberständen, wenn es in einer subinhibitorischen Dosis eingesetzt wurde (Morita *et al.* 2004). In der Veterinärmedizin spielt Colistin noch immer eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Darminfektionen des Schweines. Allerdings gibt es auch hier nur eine einzige Studie, welche den Einfluss von Colistin auf Stx2e behandelt (Uemura *et al.* 2004). Darin beeinflusste Colistin die Stx2e-Bildung und/oder -Freisetzung des EDEC-Stammes MVH 269 nicht, wenn seine Konzentration der MHK entsprach. Erst in 50-fach höherer Konzentration ließ Colistin die Menge an zellassoziertem Stx2e abnehmen.

Folgende Tetrazykline wurden bislang hinsichtlich ihrer Effekte auf die Stx-Konzentration untersucht: Doxzyklin, Minozyklin und Tetrazyklin (Walterspiel *et al.* 1992, Yoh *et al.* 1997). Die Auswirkungen von Doxzyklin und Minozyklin wurden nur bei einem einzigen Stamm geprüft, beide Substanzen wurden dabei in mehreren subinhibitorischen Konzentrationen eingesetzt. Die jeweils niedrigste Dosis der beiden Antibiotika (2 % bzw. 10 % MHK) bewirkte einen Anstieg des Stx1-Gehaltes im Kulturüberstand (Yoh *et al.* 1997). In einer anderen Studie stimulierte Tetrazyklin je nach Dosis 3 oder 4 von 5 untersuchten STEC-Stämmen zur Bildung und/oder Freisetzung von mehr Stx1 in den Kulturüberständen (Walterspiel *et al.* 1992). Untersuchungen zum Einfluss von Tetrazyklinen auf die Stx2e-Produktion von porcinen STEC sind bisher nicht publiziert.

Die Auswirkung von Makroliden auf die Stx-Produktion von STEC-Stämmen ist besonders gut untersucht. Bei der Anzucht verschiedener STEC-Stämme in Anwesenheit von subinhibitorischen Dosen an Azithromycin, Erythromycin oder Tylosin kam es bei einzelnen Stämmen zu einem Konzentrationsanstieg des freien Stx1 und/oder Stx2 (Grif *et al.* 1998, Morita *et al.* 2004, Pedersen *et al.* 2008). Überwiegend führten die verwendeten Makrolide jedoch zu einer Konzentrationsabnahme des Stx1 bzw. Stx2 im Überstand oder beeinflussten die Stx-Menge gar nicht (Grif *et al.* 1998, Köhler *et al.* 2000, Murakami *et al.* 2000, Ohara *et al.* 2002, Pedersen *et al.* 2008). Tylosin, ein Makrolid, welches häufig zur Behandlung bakterieller Infektionen des Schweines eingesetzt wird, verursachte bei allen drei STEC-Stämmen, an denen seine Auswirkung untersucht wurde, eine herabgesetzte Stx2-Konzentration im Kulturüberstand (Köhler *et al.* 2000). Dabei handelte es sich allerdings nicht um Isolate von Schweinen, sondern von Menschen.

Chinolone sind als potente Auslöser der SOS-Antwort in Bakterien ebenfalls in der Lage, die Stx-Produktion zu steigern (McGannon *et al.* 2010). Der Zusatz von Chinolon-Antibiotika während der Anzucht von humanen oder bovinen STEC-Stämmen führte bei den meisten der geprüften Stämme zu einer Erhöhung der Stx1- bzw. der Stx2-Konzentration. Von den insgesamt 142 STEC-Stämmen, die in verschiedenen Studien untersucht wurden, kam es bei 109 Stämmen (76,8 %) unter dem Einfluss eines Chinolons zu einem Konzentrationsanstieg von Stx1 und/oder Stx2 (Walterspiel *et al.* 1992, Grif *et al.* 1998, Kimmitt *et al.* 2000, Murakami *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2000, Ohara *et al.* 2002, Ochoa *et al.* 2007, Maurer *et al.* 2008, Pedersen *et al.* 2008, Ichinohe *et al.* 2009, Łoś *et al.* 2010). Dabei wirkten sowohl subinhibitorische als auch inhibitorische Dosen stimulierend. Die Untersucher beobachteten den Konzentrationsanstieg sowohl beim freien als auch beim zellassozierten Stx, wobei die Auswirkung der Chinolonexposition auf das freie Stx häufiger untersucht wurde als auf das zellassozierte Stx. Nach 4-stündiger Inkubation mit Enrofloxacin (f. c. 0,25 µg/ml, 37 °C, 180 rpm) konnte bei 44/46 STEC-Stämmen (95,7 %), davon 42/46 stx<sub>2</sub><sup>+</sup>, die von gesunden

Rindern isoliert worden waren, Stx mit dem ELISA (Gesamt-Stx-Gehalt der bakteriellen Kultur ohne Unterscheidung nach zellassoziiertem bzw. freiem Stx) nachgewiesen werden (Maurer *et al.* 2008). Darunter waren auch zwei Stämme ohne  $stx_2$ -Gen, welche womöglich einen Stx2-Subtyp aufwiesen. Konstitutiv, d. h. ohne Zugabe von Enrofloxacin, war nur bei 19/46 Stämmen (41,3 %) eine Stx-Bildung nachgewiesen worden. Die Exposition der drei EHEC-Stämme 306-7, E-1057 und E-MCD ( $stx_1^+/stx_2^+$ ) sowie der beiden STEC-Stämme H-19 und H-30 (beide  $stx_1^+$ ) gegenüber Ciprofloxacin in jeweils zwei verschiedenen subinhibitorischen Konzentrationen führte bei allen fünf Stämmen zu einer Steigerung der freien Stx1-Konzentration (Walterspiel *et al.* 1992). Dabei war die Erhöhung der Stx1-Menge bei Einsatz der höheren Ciprofloxacin-Konzentration im Mittel größer als bei Einsatz der niedrigeren Ciprofloxacin-Konzentration (Zunahme von Stx1 auf 169 bis 436 % versus Zunahme auf 115 bis 197 %). Der Stx1-Nachweis erfolgte mit einem Gb3-ELISA. Bisher wurde die Auswirkung von Chinolonen auf die Stx-Produktion und/oder -Freisetzung nur an einem einzigen Feldisolat von einem Schwein (MVH 269) untersucht (Uemura *et al.* 2004). Bei diesem Stamm hatte Enrofloxacin keinen Einfluss auf die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand. Beim Einsatz von Enrofloxacin in einer inhibitorischen Dosis nahm die Konzentration des zellassoziierten Stx2e sogar ab.

Eine gesteigerte Biosynthese von Stx setzt eine Zunahme der Anzahl der  $stx$ -Genkopien sowie eine Zunahme an  $stx$ -spezifischer mRNA voraus (Ichinohe *et al.* 2009). Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass bestimmte Antibiotika einen Anstieg von  $stx_1$ - bzw.  $stx_2$ -spezifischer mRNA bewirken und in der Lage sind, die Anzahl an Genkopien von  $stx_1$  bzw.  $stx_2$  zu steigern. So war bei einer Stimulation des Stammes Iwate M1-2 ( $stx_1^+$  und  $stx_2^+$ ) mit Norfloxacin vermehrt  $stx_1$ - bzw.  $stx_2$ -spezifische mRNA nachweisbar und die Anzahl an  $stx_1$ - bzw.  $stx_2$ -Genkopien hatte sich vervielfacht (Ichinohe *et al.* 2009). Allerdings war in der genannten Untersuchung kein Bezug zur nachweisbaren Stx-Proteinmenge hergestellt worden. Für den Stx-Subtyp Stx2e wurde dieser Zusammenhang von Beutin *et al.* (2008) aufgezeigt. An fünf STEC-2e-Stämmen konnte demonstriert werden, dass die Höhe der mit einem ELISA detektierten Stx2e-Konzentration mit der Menge an  $stx_{2e}$ -spezifischer mRNA korrelierte. Nur bei den drei Stämmen, bei welchen unter dem Einfluss von MMC die Stx2e-Konzentration angestiegen war, war auch ein Anstieg der  $stx_{A_{2e}}$ -Transkriptionsrate (10- bis 1.000-fach) beobachtet worden. Kimmitt *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Chinolone Nalidixinsäure, Ofloxacin und Ciprofloxacin in der Lage sind, die Transkription, ausgehend vom Stx2-Promotor, zu steigern. Dazu war bei dem Stamm RV31 das  $stx_2$ -Gen durch das  $lacZ$ -Gen ersetzt worden, sodass die Expression dieses Reportergens durch den Stx2-Promotor gesteuert wurde. Eine Induktion des  $stx_2$ -Operons resultierte bei diesem mutierten Stamm somit in einem Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase. Alle drei Chinolone stimulierten die  $\beta$ -



Galaktosidase-Aktivität dieses Stammes. Für Ofloxacin wurde außerdem bestätigt, dass es nicht nur die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im mutierten Stamm ankurbelte, sondern auch die Stx2-Expression im Wildtyp-Stamm. Unter dem Einfluss von Ofloxacin stieg Stx2 im Kulturüberstand um mehr als 200-fach an.

Inwieweit Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen auch auf die Reaktion von STEC-Stämmen *in vivo* übertragen werden können, ist unklar. Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Stx-Bildungsvermögen bestimmter STEC-Stämme *in vitro* und demjenigen *in vivo*. So wurde im Mausmodell gezeigt, dass die *in vitro* mit Ciprofloxacin stimulierte Stx2-Bildung auch *in vivo* auftritt. Die Konzentration des fäkalen Stx2 war bei Mäusen, die mit dem STEC-Stamm 1:361R inokuliert worden waren und anschließend eine intraperitoneale Behandlung mit Ciprofloxacin erhalten hatten, höher als bei den nicht behandelten Mäusen. Die gesteigerte intrainestinale Stx2-Konzentration führte bei einem Großteil der Tiere sogar zum Tod (Zhang *et al.* 2000). Teel *et al.* (2002) untersuchten die Produktion der Stx-Varianten Stx2d1 bzw. Stx2d2 (gemäß Nomenklatur nach Scheutz *et al.* Stx2d1-O91-B2F1 bzw. Stx2d2-O91-B2F1) unter dem Einfluss von Mitomycin C, Ciprofloxacin und Fosfomycin *in vitro* sowie *in vivo* bei Mäusen. Die Stx2d1-Produktion wurde *in vitro* durch Mitomycin C und Ciprofloxacin gesteigert. Ein Anstieg war auch *in vivo* bei den mit Ciprofloxacin behandelten Mäusen festzustellen, bei denen der Toxingehalt in den Fäzes bis zu doppelt so hoch war wie bei den nicht behandelten Tieren. Die Auswirkung einer antibiotischen Behandlung von Schweinen mit Colistin auf die Entwicklung der Ödemkrankheit wurde von einer Forschergruppe aus Tschechien untersucht (Konstantinova *et al.* 2008). Die intramuskuläre Applikation von Colistin ging bei Absetzferkeln, welche zuvor mit dem EDEC-Stamm *E. coli* 11.313 infiziert worden waren, in 10 von 11 Fällen mit der klinischen Manifestation der Ödemkrankheit einher, während bei den nicht antibiotisch behandelten Tieren die Erkrankung nur in 5 von 10 Fällen ausbrach. Die Autoren vermuteten als Grund für das häufigere Auftreten der Ödemkrankheit bei den behandelten Tieren allerdings nicht eine gesteigerte Stx-Bildung der EDEC-Bakterien, sondern die von Colistin verursachte Lyse der Bakterienzellen mit daraus resultierender vermehrter Freisetzung des Stx2e. Eine Quantifizierung des fäkalen Stx2e erfolgte nicht. Einen weiteren Hinweis darauf, dass die Ergebnisse von *in vitro*-Versuchen zur Stx-Produktion auch Rückschlüsse auf die Situation *in vivo* ermöglichen, geben die Ergebnisse von Zhang *et al.* (2009). *In vitro* steigerte die Anzucht verschiedener STEC-Stämme in Anwesenheit von Ciprofloxacin in subinhibitorischer Dosierung die Menge an nachweisbarem Stx2. Azithromycin hatte dagegen *in vitro* keinen Effekt auf die Stx2-Produktion. Die Behandlung gnotobiotischer Ferkel mit Ciprofloxacin, welche zuvor mit dem STEC-Stamm 86-24 infiziert worden waren, schützte nicht vor der Entwicklung schwerer neurologischer Symptome. Gleichzeitig war die Stx2-Konzen-

tration im Darminhalt bei diesen Tieren um ein Vielfaches höher als bei Tieren der nicht behandelten Kontrollgruppe, sofern noch Bakterienzellen nachweisbar waren. Im Zäkuminhalt der Ferkel, die mit Azithromycin behandelt worden waren, war die Stx2-Konzentration dagegen signifikant niedriger als bei den nicht behandelten Tieren (Zhang *et al.* 2009).

Tabelle 4: Einfluss antimikrobieller Wirkstoffe auf die Stx-Produktion und/oder -Freisetzung bei STEC-Stämmen *in vitro*

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Amino- glykoside	Gentamicin	0,25 µg/ml (100 % MHK), 50 x 0,25 µg/ml (5.000 % MHK)	Stx2e	MVH 269 (O139, S, ED)	im K-Üst o. V. bei 100 % bzw. 5.000 % MHK; im USL-Üst o. V. bei 100 % MHK, Abnahme bei 5.000 % MHK	Vero-ZT	4 h, 37 °C	U04
		4 µg/ml (50 % MHK) 8 µg/ml (50 % MHK) 2 µg/ml (50 % MHK)	Stx1	1193/89 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
			Stx2	3574/92 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg			
	Gentamicin	3 µg/ml (100% MHK)	Stx1 + 2	5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg			
				29 STEC-Stämme	im K-Üst: Anstieg (+)/Abnahme (-)		24 h, 37 °C	P08
			Stx1	4 x Stx1	4 x +			
			Stx2	10 x Stx2	1 x +, 9 x -			
			Stx2b	4 x Stx2b	4 x -			
			Stx2c	6 x Stx2c	6 x -			
			Stx2d3	2 x Stx2d3	2 x -			
			Stx2d	3 x Stx2d	3 x -			
			Stx1/2	M24 (Stx2, O157:H7), M108 (Stx2, O157:H7), M91 (Stx1 + 2, O157:H-), M72 (Stx1, O103:H2)	im K-Üst Abnahme	ELISA, Vero-ZT	18 h, 37 °C	M10

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Amino- glykoside	Gentamicin	0,25 µg/ml (10 % MHK), 1,25 µg/ml (50 % MHK)	Stx1/2	RIMD 0509890 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg von Stx1 (ca. 1,5-fach) bei 10 % MHK	RPLA	16 h, 37 °C	Y97
	Streptomycin	32 µg/ml 32 µg/ml 16 µg/ml (jeweils 50 % MHK)	Stx1 Stx2 Stx1 + 2	1193/89 (O157:H7) 3574/92 (O157:H7) 5769/87 (O157:H7)	im K-Üst nicht nachweisbar im K-Üst Anstieg 10-fach im K-Üst Anstieg	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
	Streptomycin	1 µg/ml (10 % MHK), 5 µg/ml (50 % MHK)	Stx1/2	RIMD 0509890 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme von Stx1/Stx2	RPLA	16 h, 37 °C	Y97
	Streptomycin	19,1 – 21,4 IE/ml (100 % MHK)	Stx1/2	3 EHEC O157:H7: FEC-43, FEC-83 ( <i>stx</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> , <i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), FEC- 70 ( <i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg von Stx1/Stx2	RPLA	30 min, 37 °C	M04
Amino- kumarine	Novobiocin	≥ MHK	Stx2	PK552 ( <i>stx</i> <sub>2A</sub> :: <i>lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 30 °C (ae) sowie bei 37 °C (mae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
Ansa- mycine/ Rifamycine	Rifaximin	0,049 – 50 µg/ml	Stx1/2	57 humane STEC- Stämme (26 x O157, 31 x Nicht- O157)	Abnahme des freien Stx	ELISA (detektiert Stx1 und 2)	5 h	O07

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Antibiotika mit zyto- statischer Wirkung	Mitomycin C	0,05 µg/ml	Stx2e	110 STEC-2e- Stämme: 9 x M, Fäzes; 21 x Umwelt; 36 x LM; 25 x S, Fäzes; 19 x S, ED/DF	Nachweis von Stx2e nach Anzucht mit MMC bei 109/110 Stämmen	P <sub>1</sub> -g-EIA	k. A.	B08
	Mitomycin C	0,5 µg/ml	Stx2e	2771/97	im K-Üst Anstieg (50-fach)	ELISA, Vero-ZT	ÜNK, 37 °C	M00
	Mitomycin C	0,5 µg/ml	Stx2e	Lysogene T9(φP27) und T21(φP27), supplementiert mit pIM10 ( <i>recA</i> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg (50- bis 100- fach)	ELISA, Vero-ZT	ÜNK, 37 °C	M00
	Mitomycin C	0,5 µg/ml	Stx2 Stx2c Stx2d	1309/99, 3733/97 4911/99, 3032/03 24196/97, 6451/98, 5293/98, 5299/98, 5300/98, 4797/97, EH250	bis 100-facher Anstieg von <i>stx4</i> - bzw. <i>stxB</i> -spezifischer mRNA bei <u>unterstrichenen</u> <u>Stämmen</u>	quantitative real time- RT-PCR	k. A.	Z05
	Mitomycin C	0,5 µg/ml	Stx2e	26725/97, 2771/97				
	Mitomycin C	0,5 µg/ml	Stx2	3538/95 (O157:H7, <i>stx<sub>2</sub></i> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 65-fach	ELISA	ÜNK, 37 °C	K500
				5720/96 (O26:H-, <i>stx<sub>2</sub></i> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 155-fach			
			Stx2e	C600(933W) ( <i>stx<sub>2</sub></i> <sup>+</sup> ) 2771/97 (ONT, <i>stx<sub>2e</sub></i> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 100-fach n. u.			

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Antibiotika mit zyto- statischer Wirkung	Mitomycin C	0,2 µg/ml	Stx1/2	38 x STEC (Stx2/2c/2 + 2c; 13 x HUS M, 25 x R); 26 x STEC (Stx1/1c); 6 x HUS M, 20 x R)	Gesamt-Stx2/2c : Anstieg bei 31/38 Stämmen (alle 13 HUS- Stämme und 18 R-Stämme); Gesamt-Stx1/1c: Anstieg bei 11/26 Stämmen (2 HUS- Stämme, 9 R-Stämme), bei 4 R-Stämmen Anstieg 13- bis 60-fach	ELISA	3 h, 37 °C	R03
	Mitomycin C	1 µg/ml	Stx2 (ersetzt durch Gfp)	<i>E. coli</i> 86-24 (O157:H7)	Anstieg der <i>stx</i> <sub>2</sub> -Expression (ersetzt durch <i>gfp</i> )*	ELISA, Western Blot, jeweils für Gfp	6 h, 37 °C in LB-Me- dium sowie in Minimal- Medium mit Glukose	L10
β-Laktame	Amoxicillin	≤ MHK	Stx2	PK552 ( <i>stx2A</i> :: <i>lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Ampicillin	256 µg/ml (100 % MHK), 12,8 mg/ml (5.000 % MHK)	Stx2e	MVH 269 (O139, S, ED)	im K-Üst Anstieg bei 100 % bzw. 5.000 % MHK; im USL-Üst Abnahme bei 100 % bzw. 5.000 % MHK	Vero-ZT	4 h, 37 °C	U04
	Ampicillin	1 µg/ml 0,5 µg/ml 0,5 µg/ml (jeweils 50 % MHK)	Stx1 Stx2 Stx1 + 2	1193/89 (O157:H7) 3574/92 (O157:H7) 5769/87 (O157:H7)	im K-Üst o. V. im K-Üst Anstieg im K-Üst o. V.	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
	Ampicillin	≤ MHK	Stx2	PK552 ( <i>stx2A</i> :: <i>lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
β-Laktame	Ampicillin	0,25 µg/ml (10 % MHK), 1,25 µg/ml (50 % MHK)	Stx1/2	RIMD 0509890 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme von Stx1/Stx2	RPLA	16 h, 37 °C	Y97
	Ampicillin	100 % MHK, 50 % MHK	Stx1/2	M24 (Stx2, O157:H7), M108 (Stx2, O157:H7), M91 (Stx1 + 2, O157:H-), M72 (Stx1, O103:H2)	im K-Üst Abnahme bei 100 % MHK (alle Stämme); im K-Üst Anstieg bei 50 % MHK (Stämme M24, M108, M72)	ELISA, Vero-ZT	18 h, 37 °C	M10
	Ampicillin	2 – 3 µg/ml (100 % MHK)	Stx1/2	3 EHEC O157:H7: FEC-43, FEC-83 ( <i>stx</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> , <i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), FEC- 70 ( <i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	im K-Üst Anstieg von Stx1/Stx2	RPLA	30 min, 37 °C	M04
	Aztreonam	≤ MHK	Stx2	PK552 ( <i>stx</i> 2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Aztreonam	0,25 µg/ml (100 % MHK)	Stx1/2	Iwate M1-2 (O157:H7), M	kein Einfluss auf die Anzahl der Genkopien von <i>stx</i> <sub>1/2</sub> , kein Einfluss auf die Menge <i>stx</i> <sub>1/2</sub> - spezifischer mRNA	quantitative real time- PCR, quantitative real time- RT-PCR	4 h, 37 °C	I09
	Cefazolin	1 µg/ml (10 % MHK), 5 µg/ml (50 % MHK)	Stx1/2	RIMD 0509890 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg von Stx1 (1,2-fach)	RPLA	16 h, 37 °C	Y97

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
β-Laktame	Cefdinir	4 µg/ml (2.000 % MHK)	Stx1/2	EHEC SS812 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg als Folge der Bakterizidie	Vero-ZT, RPLA	6 h, 37 °C	Mu00
	Cefixim	0,0015 µg/ml (50 % MHK)	Stx1	1193/89 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
		0,0008 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	3574/92 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg			
		0,0015 µg/ml (50 % MHK)	Stx1 + 2	5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme			
	Cefixim	„high“ sowie „low“ concen- tration <sup>1)</sup>	Stx1/2	306-7 (O157:H7), E-1057 (O157:H7), E-MCD (O157:H7)	„high concentration“: im K-Üst Anstieg von Stx1 bei 3/5 Stämmen (E-1057, E-MCD, H-30); „low concentration“: im K-Üst Anstieg von Stx1 nur bei E-1057, sonst Abnahme	Gb3-ELISA (nur Nach- weis von Stx1)	18 h, 37 °C	W92
	Cefotaxim	≤ MHK	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Cefotaxim	100 % MHK, 50 % MHK	Stx1/2	M24 (Stx2, O157:H7), M108 (Stx2, O157:H7), M91 (Stx1 + 2, O157:H-), M72 (Stx1, O103:H2)	im K-Üst Abnahme bei 100 % MHK sowie 50 % MHK (alle Stämme)	ELISA, Vero-ZT	18 h, 37 °C	M10

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite



Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
β-Laktame	Ceftazidim	0,125 µg/ml (100 % MHK)	Stx1/2	Iwate M1-2 (O157:H7), M	Reduktion der Anzahl der Gen- kopien von <i>stx</i> <sub>1/2</sub> , Kein Einfluss auf die Menge <i>stx</i> <sub>1/2</sub> - spezifischer mRNA	quantitative real time- PCR, quantitative real time- RT-PCR	4 h, 37 °C	I09
	Ceftriaxon	0,5 µg/ml (50 % MHK) 0,0025 µg/ml (50 % MHK) 0,05 µg/ml (50 % MHK)	Stx1 Stx2 Stx1 + 2	1193/89 (O157:H7) 3574/92 (O157:H7) 5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme im K-Üst Anstieg im K-Üst Abnahme	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
	Cefuroxim	0,625 µg/ml (≤ MHK)	Stx2	PK552 ( <i>stx</i> 2A:: <i>lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg	β-Gal- Reporter- genassay	24 h, 37 °C	K00
Cephalosporine	Cefuroxim	≤ MHK	Stx2	PK552 ( <i>stx</i> 2A:: <i>lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Cephalexin	≤ MHK	Stx2	PK552 ( <i>stx</i> 2A:: <i>lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae) und bei 30 °C (ae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Penicillin G	128 µg/ml	Stx1 Stx2 Stx1 + 2	1193/89 (O157:H7) 3574/92 (O157:H7) 5769/87 (O157:H7)	im K-Üst nicht nachweisbar im K-Üst Anstieg im K-Üst Anstieg	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingun- gen	Refe- renz <sup>4)</sup>
β-Laktame	Piperacilin/ Tazobactam	≤ MHK	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Carba- peneme	0,25 µg/ml (100 % MHK)	Stx1/2	Iwate M1-2 (O157:H7), M (O157:H7)	Abnahme der Anzahl der Gen- kopien von stx <sub>12</sub> bzw. der Menge stx <sub>12</sub> -spezifischer mRNA	quantitative real time- PCR, quantitative real time- RT-PCR	4 h, 37 °C	I09
Chinolone	Diverse: Cinoxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Flumequin, Nalidixin- säure, Norfloxacin, Ofloxacin, Perfloxacin	≥ MHK	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei allen Wirkstoffen und Inkubationsbedingungen	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Ciprofloxacin	0,01 µg/ml (50 % MHK) 0,005 µg/ml (50 % MHK) 0,01 µg/ml (50 % MHK)	Stx1 Stx2 Stx1 + 2	1193/89 (O157:H7) 3574/92 (O157:H7) 5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg im K-Üst Abnahme im K-Üst Anstieg	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
	Ciprofloxacin	„high“ sowie „low“ concen- tration <sup>1)</sup>	Stx1/2 Stx1	306-7 (O157:H7), E-1057 (O157:H7), E-MCD (O157:H7) H-30 (O26:H11), H-19 (O26:H11)	„high“ sowie „low concentration“ im K-Üst Anstieg von Stx1 bei 5/5 Stämmen	Gb3-ELISA (nur Nach- weis von Stx1)	18 h, 37 °C	W92

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Chinolone	Ciprofloxacin	0,016 µg/ml (100 % MHK)		29 STEC-Stämme	im K-Üst: Anstieg (+)/Abnahme (-)	Vero-ZT	24 h, 37 °C	P08
			Stx1	4 x Stx1	2 x +, 1 x -, 1 x n. u.			
			Stx2	10 x Stx2	4 x + 5 x -, 1 x n. u.			
			Stx2b	4 x Stx2b	2 x -, 2 x n. u.			
			Stx2c	6 x Stx2c	3 x +, 1 x -, 2 x n. u.			
			Stx2d3	2 x Stx2d3	1 x +, 1 x -			
			Stx2d	3 x Stx2d	1 x +, 2 x -			
	Ciprofloxacin	0,025 µg/ml	Stx2	STEC 1:361R (O157:H7)	Gesamt-Stx2: Anstieg 17- bzw. 60-fach (3 bzw. 6 h nach Induktion)	EIA	bis zu 6 h, 37 °C	Z00
	Ciprofloxacin	0,049 – 50 µg/ml	Stx1/2	57 humane STEC- Stämme (26 x O157, 31 x Nicht-O157)	Stx-Freisetzung bei 25/26 Stämmen (O157) bzw. bei 15/31 Stämmen (Nicht-O157)	ELISA	5 h	O07
	Enrofloxacin	0,125 µg/ml (100 % MHK), 6,25 µg/ml (5.000 % MHK)	Stx2e	MVH 269 (O139, S, ED)	im K-Üst o. V. bei 100 % bzw. 5.000 % MHK; im USL-Üst Abnahme bei 100 % bzw. 5.000 % MHK	Vero-ZT	4 h, 37 °C	U04
	Enrofloxacin	bis zu 100 µg/ml	Stx2	2 x bovine O157:H7- HSVR 149, HSVR 87 sowohl native Stämme als auch Enrofloxacin- resistente Mutanten	Anstieg von Stx2 bei nativen Stämmen und bei Mutanten, Stx2-Menge bei Mutanten 3 x höher als bei nativen Stämmen	ELISA	bis zu 24 h	M09
				46 bovine STEC- Feldstämme (O157:H7/H7-)	Anstieg des Gesamt-Stx2 bei 44/46 Stämmen, davon 2/44 stx <sub>2</sub> -negativ	ELISA	4 h, 37 °C, 180 rpm	M08

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Chinolone	Levofloxacin	0,5 µg/ml (2.000 % MHK)	Stx1/2	EHEC SS812 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg als Folge der Bakterizidie	Vero-ZT, RPLA	6 h, 37 °C	Mu 00
	Norfloxacin	1 µg/ml	Stx1/2	RIMD 0509894 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg	RPLA	2 h, 37 °C nach 30 min IKZ mit AB	M99
	Norfloxacin	0,1 µg/ml	Stx2	EHEC-Stamm 1076 (O86:H-)	Anstieg des Gesamt-Stx2 (512-fach)	RPLA	2 h, 37 °C nach 30 min IKZ mit AB	Y00, O02
	Norfloxacin	0,25 µg/ml (100 % MHK)	Stx1/2	Iwate M1-2 (O157:H7), M	Anstieg der Anzahl der Gen- kopien von <i>stx</i> <sub>1/2</sub> bzw. der Menge <i>stx</i> <sub>1/2</sub> -spezifischer mRNA; Anstieg am höchsten nach 4 h IKZ	quantitative real time- PCR, quantitative real time- RT-PCR	bis zu 12 h, 37 °C	I09
	Norfloxacin	0,2 µg/ml	Stx2 (ersetzt durch Gfp)	<i>E. coli</i> 86-24 (O157:H7)	Anstieg der <i>stx</i> <sub>2</sub> -Expression (ersetzt durch <i>gfp</i> *)	ELISA, Western Blot; jeweils für Gfp	6 h, 37 °C in LB- Medium sowie in Minimal- Medium mit Glukose	L10
	Ofloxacin	0,4 µg/ml (> MHK), 0,1 µg/ml (> MHK)	Stx2	PK552 ( <i>stx</i> 2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg	β-Gal- Reporter- genassay	4 h, 37 °C	K00

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Chinolone	Ofloxacin	1,6 µg/ml (> MHK), 0,4 µg/ml Derivat von RV31 (O157:H7)	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg (> 50-fach)	β-Gal- Reporter- genassay	24 h, 37 °C	K00
		0,1 µg/ml (> MHK)						
Diamino- pyrimidine	Ofloxacin	0,5 µg/ml (> MHK)	Stx2	RV31 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg (200-fach)	Zellkultur- Test	3,5 h, 37 °C	K99
		2 µg/ml (50 % MHK)	Stx1	1193/89 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg bei allen Stämmen (10- bis 40-fach)	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
	Trimethoprim	2 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	3574/92 (O157:H7)				
		2 µg/ml (50 % MHK)	Stx1 + 2	5769/87 (O157:H7)				
		2,4 µg/ml (> MHK), 0,6 µg/ml und 0,075 µg/ml (≤ MHK)	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg	β-Gal- Reporter- genassay	4 h, 37 °C	K00
	Trimethoprim	9,6 u. 2,4 µg/ml (> MHK), 0,6 u. 0,075 µg/ml (≤ MHK)	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg	β-Gal- Reporter- genassay	24 h, 37 °C	K00
		Trimethoprim ≥ MHK	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 30 °C (ae) u. 37 °C (ae, mae, an)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Ionophore	Monensin	alle 128 µg/ml (≤ 6,25 % MHK)	Stx2	3538/95 (O157:H7, stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 5720/96 (O26:H-, stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), C600(933W) (stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Abnahme im K-Üst Abnahme im K-Üst Abnahme n. u.	ELISA	ÜNK, 37 °C	K500
			Stx2e	2771/97 (ONT, stx <sub>2e</sub> <sup>+</sup> )				
			Stx1/2	EHEC SS812 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme nach 6, 8, 10, 12 und 14 h	Vero-ZT, RPLA	14 h, 37 °C	Mu00
Lincosamide	Clindamycin	1,56 µg/ml (6,25 % MHK), 3,12 µg/ml (12,5 % MHK), 6,25 µg/ml (25 % MHK)						
Makrolide	Azithromycin	0,005 µg/ml (50 % MHK) 0,0025 µg/ml (50 % MHK) 0,005 µg/ml (50 % MHK)	Stx1	1193/89 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg bei allen Stämmen	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
			Stx2	3574/92 (O157:H7)				
			Stx1 + 2	5769/87 (O157:H7)				
	Azithromycin	0,25 µg/ml (100 % MHK)		29 STEC-Stämme	im K-Üst: Anstieg (+)/Abnahme (-)	Vero-ZT	24 h, 37 °C	P08
			Stx1	4 x Stx1	3 x + (2 x O157:H7), 1 x -			
			Stx2	10 x Stx2	2 x + (2 x O157:H7), 8 x -			
			Stx2b	4 x Stx2b	4 x -			
			Stx2c	6 x Stx2c	6 x -			
			Stx2d3	2 x Stx2d3	2 x -			
			Stx2d	3 x Stx2d	3 x -			
			Stx2	EHEC-Stamm 1076 (O86:H-)	keine Auswirkung auf Gesamt- Stx2	RPLA	2 h, 37 °C nach 30 min IKZ mit AB	Y00, O02

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Makrolide	Erythromycin	alle 128 µg/ml	Stx1 Stx2 Stx1 + 2	1193/89 (O157:H7) 3574/92 (O157:H7) 5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme im K-Üst Anstieg im K-Üst Abnahme	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
	Erythromycin	238 - 285 µg/ml	Stx1/2	3 EHEC O157:H7: FEC-43, FEC-83 (stx <sub>1</sub> <sup>+</sup> , stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), FEC- 70 (stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	Anstieg von Stx1/Stx2	RPLA	30 min, 37 °C	M04
	Rokitamycin	1.56 µg/ml (6,25 % MHK), 3.12 µg/ml (12,5 % MHK), 6.25 µg/ml (25 % MHK)	Stx1/2	EHEC SS812 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme nach 6, 8, 10, 12 und 14 h	Vero-ZT, RPLA	14 h, 37 °C	Mu00
	Roxithro- mycin	1.56 µg/ml (6,25 % MHK), 3.12 µg/ml (12,5 % MHK), 6.25 µg/ml (25 % MHK)	Stx1/2	EHEC SS812 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme nach 6, 8, 10, 12 und 14 h	Vero-ZT, RPLA	14 h, 37 °C	Mu00
	Telithromycin	8 µg/ml (100 % MHK)	Stx1 Stx2 Stx2b Stx2c Stx2d3 Stx2d	29 STEC-Stämme  4 x Stx1 10 x Stx2 4 x Stx2b 6 x Stx2c 2 x Stx2d3 3 x Stx2d	im K-Üst: Anstieg (+)/Abnahme (-) 2 x + (2 x O157:H7), 2 x - 1 x + (O157:H7), 9 x - 4 x - 6 x - 2 x - 3 x -	Vero-ZT	24 h, 37 °C	P08

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Makrolide	Tylosin	512 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	3538/95 (O157:H7, <i>stx<sub>2</sub><sup>+</sup></i> )	im K-Üst Abnahme	ELISA	ÜNK, 37 °C	K600
				5720/96 (O26:H-, <i>stx<sub>2</sub><sup>+</sup></i> )	im K-Üst Abnahme			
				C600(933W) ( <i>stx<sub>2</sub><sup>+</sup></i> )	im K-Üst Abnahme			
Nitrofurane	Furazolidon	1.024 µg/ml (50 % MHK)  16, 8, 4, 2 und 1 µg/ml (alle ≤ MHK)	Stx2e	2771/97 (ONT, <i>stx<sub>2e</sub><sup>+</sup></i> )	n. u.			
			Stx2	PK552 ( <i>stx2A::lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg	β-Gal- Reporter- genassay	4 h, 37 °C	K00
			Stx2	PK552 ( <i>stx2A::lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	moderater Anstieg	β-Gal- Reporter- genassay	24 h, 37 °C	K00
Peptidanti- biotika	Furazolidon	16, 8, 4, 2 und 1 µg/ml (alle ≤ MHK)	Stx2	PK552 ( <i>stx2A::lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae) und bei 30 °C (ae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
				PK552 ( <i>stx2A::lacZ</i> ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae) und bei 30 °C (ae)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
				MVH 269 (O139, S, ED)	im K-Üst o. V. bei 100 % bzw. 5.000 % MHK; im USL-Üst o. V. bei 100 % MHK, Abnahme bei 5.000 % MHK	Vero-ZT	4 h, 37 °C	U04
	Colistin	0,25 µg/ml (100 % MHK), 12,5 µg/ml (5.000 % MHK)	Stx2e	3 EHEC O157:H7; FEC-43, FEC-83 ( <i>stx<sub>1</sub><sup>+</sup></i> , <i>stx<sub>2</sub><sup>+</sup></i> ), FEC- 70 ( <i>stx<sub>2</sub><sup>+</sup></i> )	im K-Üst Anstieg von Stx1/Stx2	RPLA	30 min, 37 °C	M04
			Stx1/2	3 EHEC O157:H7; FEC-43, FEC-83 ( <i>stx<sub>1</sub><sup>+</sup></i> , <i>stx<sub>2</sub><sup>+</sup></i> ), FEC- 70 ( <i>stx<sub>2</sub><sup>+</sup></i> )	im K-Üst Anstieg von Stx1/Stx2	RPLA	30 min, 37 °C	M04

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite



Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Sulfonamide	Cotrimoxazol (Trimetho- prim/ Sulfa- methoxazol 1/20)	alle 0,12/2,375 µg/ml (50 % MHK)	Stx1	1193/89 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
			Stx2	3574/92 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg			
			Stx1 + 2	5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg			
	Sulfa- methoxazol	4,75 µg/ml (50 % MHK)	Stx1	1193/89 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
		152 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	3574/92 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg			
		152 µg/ml (50 % MHK)	Stx1 + 2	5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme			
	Sulfa- methoxazol	≥ MHK	Stx2	PK552 (stx2A::lacZ), Derivat von RV31 (O157:H7)	Anstieg bei 37 °C (ae, mae, an)	β-Gal- Reporter- genassay	30, 37 u. 42 °C; ae, mae u. an	K00
	Sulfa- methoxazol + Trimethoprim	0,5 µg/ml (100 % MHK), 25 µg/ml (5.000 % MHK)	Stx2e	MVH 269 (O139, S, ED)	im K-Üst o. V. bei 100 % bzw. 5.000 % MHK; im USL-Üst o. V. bei 100 % bzw. 5.000 % MHK	Vero-ZT	4 h, 37 °C	U04
	Sulfa- methoxazol + Trimethoprim	„high“ sowie „low“ concen- tration <sup>1)</sup>	Stx1/2	306-7 (O157:H7), E-1057 (O157:H7), E-MCD (O157:H7)	„high concentration“: im K-Üst Anstieg von Stx1 zwischen 122 % (E-MCD) und 219 % (E-1057); „low concentration“: im K-Üst Anstieg von Stx1 nur bei E-1057, sonst Abnahme	Gb3-ELISA (nur Nach- weis von Stx1)	18 h, 37 °C	W92
			Stx1	H-30 (O26:H11), H-19 (O26:H11)				

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Sulfonamide	Sulfamethoxazol + Trimethoprim (5:1)	≤ MHK (1/16 x MHK von EDL 933)	Stx	<i>S. dysenteriae</i> I S31 <sup>4)</sup>	Gesamt-Stx: Anstieg bei allen 4 Stämmen	HeLa-Zell- ZT und -NT	24 h, 37 °C	K86
			Stx1	H30 (O26:H11), 240 (O111:H6)				
			Stx1/2	EDL 933 (O157:H7)				
	Sulfamethoxazol + Trimethoprim (5:1)	≤ MHK (1/16 x MHK von EDL 933)	Stx	<i>S. dysenteriae</i> I 60R <sup>2)</sup>	Stx-Produktion: Anstieg bei allen Stämmen	Kolonie- Blot; Detektion der Stx mit mAk gegen Stx1	24 h, 37 °C	K86
Tetracykline	Doxzyklin	1 µg/ml (2 % MHK), 5 µg/ml (10 % MHK), 25 µg/ml (50 % MHK)	Stx1	H30 (O26:H11), H-19 (O26:H11), 240 (O111:H6), K12(395-I)				
			Stx1/2	EDL 933 (O157:H7)				
			Stx1/2	RIMD 0509890 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg von Stx1 bei 2 % MHK	RPLA	16 h, 37 °C	Y97
	Minozyklin	2 µg/ml (10 % MHK), 10 µg/ml (50 % MHK)	Stx1/2	RIMD 0509890 (O157:H7)				

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Tetracykline	Tetracyclin	„high“ sowie „low“ concen- tration <sup>1)</sup>	Stx1/2	306-7 (O157:H7), E-1057 (O157:H7), E-MCD (O157:H7)	„high concentration“: im K-Üst Anstieg von Stx1 bei allen Stämmen außer H-30; „low concentration“: im K-Üst Anstieg von Stx1 bei E-1057, E-MCD und 306-7, sonst Abnahme	Gb3-ELISA (nur Nach- weis von Stx1)	18 h, 37 °C	W92
			Stx1	H-30 (O26:H11), H-19 (O26:H11)				
			Stx2	3538/95 (O157:H7, stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 124-fach	ELISA	ÜNK, 37 °C	K600
			Stx2	5720/96 (O26:H-, stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 58-fach			
			Stx2	C600(933W) (stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 27-fach			
Wachstums- förderer	Carbadox	1 µg/ml (50 % MHK)	Stx2e	2771/97 (ONT, stx <sub>2e</sub> <sup>+</sup> )	n. u.			
		4 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	3538/95 (O157:H7, stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 85-fach	ELISA	ÜNK, 37 °C	K600
		0,5 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	5720/96 (O26:H-, stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 44-fach			
		8 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	C600(933W) (stx <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	im K-Üst Anstieg 88-fach			
		alle 8 µg/ml (50 % MHK)	Stx2	2771/97 (ONT, stx <sub>2e</sub> <sup>+</sup> )	n. u.			
Sonstige	Bicozamycin	16 µg/ml (100 % MHK), 800 µg/ml (5.000 % MHK)	Stx2e	MVH 269 (O139, S, ED)	im K-Üst o. V. bei 100 % bzw. 5.000 % MHK; im USL-Üst o. V. bei 100 % MHK, Abnahme bei 5.000 % MHK	Vero-ZT	4 h, 37 °C	U04

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Sonstige	Fosfomycin	16 µg/ml (100 % MHK), 800 µg/ml (5.000 % MHK)	Stx2e	MVH 269 (O139, S, ED)	im K-Üst Anstieg bei 100 % bzw. 5.000 % MHK; im USL-Üst Abnahme bei 100 % bzw. 5.000 % MHK	Vero-ZT	4 h, 37 °C	U04
			Stx1	1193/89 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg	Vero-ZT, LDH-ZT	24 h, 37 °C	G98
			Stx2	3574/92 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg			
	Fosfomycin	8 µg/ml (50 % MHK) 8 µg/ml (50 % MHK) 16 µg/ml (50 % MHK)	Stx1 + 2	5769/87 (O157:H7)	im K-Üst Abnahme			
			Stx1/2	EHEC SS812 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg als Folge der Bakterizidie	Vero-ZT, RPLA	6 h, 37 °C	Mu00
			Stx1/2	RIMD 0509890 (O157:H7)	im K-Üst Anstieg von Stx1 (ca. 7-fach) bei 10 % MHK	RPLA	16 h, 37 °C	Y97
	Fosfomycin	100 µg/ml (10 % MHK), 500 µg/ml (50 % MHK)	Stx1/2	RIMD 0509891, 0509881, 0509910, 0509908 (nur stx <sub>1</sub> ), 0509888, 0509887, 0509886, 0509909, 0509861, 0509890	im K-Üst Anstieg von Stx1 bei allen Stämmen (3- bis 38- fach); im K-Üst Abnahme von Stx2 bei allen Stämmen außer RIMD 0509909 (Anstieg ca. 2- fach)	RPLA	14 h, 37 °C	Y97
			Stx2	STEC 1:361R (O157:H7)	Abnahme des Gesamt-Stx2	EIA	6 h, 37 °C	Z00

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Wirkstoff- klasse	Wirkstoff	Dosis	Stx-Typ, -Subtyp <sup>3)</sup>	STEC-Stamm (Herkunft/ Serotyp)	Auswirkungen	Quantifi- zierung von Stx	Inkuba- tionsbe- dingungen	Refe- renz <sup>4)</sup>
Sonstige	Fosfomycin	1 µg/ml (100 % MHK)	Stx1/2	Iwate M1-2 (O157:H7), M	Anstieg der Anzahl der Gen- kopien von <i>stx</i> <sub>1/2</sub> nach 1 h, anschließend Reduktion der Genkopien von <i>stx</i> <sub>1/2</sub> bzw. der Menge <i>stx</i> <sub>1/2</sub> -spezifischer mRNA	quantitative real time- PCR, quantitative real time- RT-PCR	bis zu 12 h, 37 °C	I09

Erläuterungen:

**AB** Antibiotikum, syn. für Chemotherapeutikum; **ae** aerob; **an** anaerob; **DF** Durchfall; **ED** *Edema Disease*, Ödemkrankheit; **EIA** Enzym-Immunassay; **ELISA** engl. *enzyme linked immunosorbent assay*; **Gfp** engl. *green fluorescent protein*; **HUS** Hämolytisch-urämisches Syndrom; **IE** Internationale Einheit; **IKZ** Inkubationszeit; **k. A.** keine Angaben; **K-Üst** Kulturüberstand; **LDH** Laktatdehydrogenase; **LDH-ZT** Laktatdehydrogenase-Zytotoxizitätstest; **LM** Lebensmittel; **M** Mensch; **mae** mikroaerophil; **mAk** monoklonale Antikörper; **MHK** minimale Hemmkonzentration; **> MHK** bzw. **≥ MHK** inhibitorische Dosis; **≤ MHK** subinhibitorische Dosis; **MMC** Mitomycin C; **nachw.** nachweisbar; **NT** Neutralisationstest; **n. u.** nicht untersucht; **o. V.** ohne Veränderung; **R Rind**; **RPLA** reverse passive Latexagglutination; **S** Schwein; **Stx** Shigatoxin; **u. und**; **ÜNK** Inkubation über Nacht; **USL-Üst** Ultraschall-Lysatüberstand; **Vero-ZT** Verozell-Zytotoxizitätstest; **ZT** Zytotoxizitätstest; \* Induktion infektiöser Phagenpartikel; **1)** Die Expositions-dosis wurde im Agardiffusionstest ermittelt. Es wurden die beiden Inokula ausgewählt, bei denen unter dem Einfluss der zwei höchsten Wirkstoffkonzentrationen gerade noch ein Bakterienwachstum auftrat. Die höchste Wirkstoffkonzentration wurde als „high concentration“ und die zweithöchste Wirkstoffkonzentration wurde als „low concentration“ bezeichnet. **2)** Bei den gekennzeichneten Stämmen handelt es sich nicht um STEC-Stämme, sie werden jedoch zur Vereinfachung ebenfalls in der betreffenden Spalte mit aufgeführt.

**3)** Die Stx-Nomenklatur folgt Calderwood *et al.* (1996).

**4)** Referenzen: **B08** Beutin *et al.* (2008); **G98** Griff *et al.* (1998); **I09** Ichinohe *et al.* (2009); **K00** Kimmitt *et al.* (2000); **K96** Karch *et al.* (1986); **K99** Kimmitt *et al.* (1999); **Kö00** Köhler *et al.* (2000); **L10** Loś *et al.* (2010); **M00** Muniesa *et al.* (2000); **M04** Morita *et al.* (2004); **M08** Maurer *et al.* (2008); **M09** Maurer *et al.* (2009); **M10** Mohsin *et al.* (2010); **M99** Matsushiro *et al.* (1999); **Mu00** Murakami *et al.* (2000); **O02** Ohara *et al.* (2002); **O07** Ochoa *et al.* (2007); **P08** Pedersen *et al.* (2008); **R03** Ritchie *et al.* (2003); **U04** Uemura *et al.* (2004); **W92** Walterspiel *et al.* (1992); **Y00** Yamamoto (2000); **Y97** Yoh *et al.* (1997); **Z00** Zhang *et al.* (2000); **Z05** Zhang *et al.* (2005).

## 2.5 Freisetzung von Stx aus der Bakterienzelle

Bei Gram-negativen Bakterien müssen die im Zytoplasma gebildeten Proteine drei Barrieren passieren, um in das extrazelluläre Medium zu gelangen: Die Zytoplasmamembran (innere Membran, IM), das periplasmatische Gel (PP), in welchem das Murein eingelagert ist sowie die äußere Membran (OM). Bei bekapselten Bakterien bildet die mehr oder weniger rigide Polysaccharidschicht eine weitere Schranke.

### Ort der Assemblierung des Stx-Holotoxins

Die Synthese der (Prä-) Proteine StxA und StxB erfolgt im Zytoplasma an den Ribosomen (Jackson *et al.* 1987a, Jackson *et al.* 1987b, China und Goffaux 1999, Beckwith 2013). Die Zusammensetzung des Holotoxin-Moleküls muss im Periplasma erfolgen, wenn man von einer Sec-abhängigen Translokation der Präproteine ins Periplasma ausgeht, wofür die N-terminalen Signalsequenzen von StxA und StxB sprechen (Weinstein *et al.* 1988b, Oloomi *et al.* 2006). Bei rStx2 wurde die Assemblierung des Stx2-Holotoxins im Periplasma experimentell nachgewiesen (Tu *et al.* 2009). Auch andere Autoren postulieren, dass das Holotoxinmolekül bei den bakteriellen A<sub>1</sub>B<sub>5</sub>-Toxinen inklusive der Shigatoxine im Periplasma der Bakterienzelle assembliert wird (McGannon *et al.* 2010, Kim *et al.* 2011). Dabei scheinen nicht assemblierte Proteinbausteine im Periplasma rasch durch Proteasen abgebaut zu werden. So kann Stx2A im Periplasma nur existieren, wenn es mit dem zugehörigen Stx2B-Pentamer gekoppelt ist (Kim *et al.* 2011). Untersuchungen zur Translokation des hitzelabilen Enterotoxins (LT) von *E. coli*, welches in einem *Vibrio cholerae*-Stamm exprimiert wurde, bieten Grund zur Annahme, dass die Subunits von A<sub>1</sub>B<sub>5</sub>-Toxinen zunächst über die Zytoplasmamembran in das Periplasma transloziert werden, wo die Assemblierung des Holotoxins erfolgt (Hirst *et al.* 1984, Hirst und Holmgren 1987, Shimizu *et al.* 2007). Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Vorstellung halten Pradel und Kollegen es für möglich, dass das komplette Holotoxin über das TAT (*twin arginin translocation*)-System in das Periplasma transloziert wird. Das TAT-System sei nämlich in der Lage, Moleküle bis zu einer Größe von 100 kDa zu translozieren, was eine vorherige Assemblierung des Holotoxins bereits im Zytoplasma implizieren würde (Pradel *et al.* 2003).

### Sekretion der Stx-Untereinheiten in den periplasmatischen Raum

Der Terminus „Sekretion“ bezeichnet typischerweise die komplette Freisetzung eines bakteriellen Proteins aus der Bakterienzelle in das umgebende Milieu (Chatzi *et al.* 2013). Zur eindeutigen Benennung wird die Ausschleusung von Proteinen vom Zytoplasma in das Periplasma nachfolgend als Export bezeichnet (China und Goffaux 1999). Die meisten bak-

teriellen Proteine werden mit dem Sec-System aus dem Zytoplasma über die Zytoplasmamembran hinweg transloziert (Chatzi *et al.* 2013). Dieses System dient dem Export sowohl von solchen Proteinen, welche im Periplasma gespeichert werden, als auch von Proteinen, welche in die innere oder äußere Membran integriert werden (Beckwith 2013, Chatzi *et al.* 2013, Kudva *et al.* 2013). Darüber hinaus bildet das Sec-System bei Gram-negativen Bakterien als Bestandteil des *general secretory pathway* (GSP) die erste gemeinsame Stufe einiger mehrstufiger Sekretionssysteme, mit denen Bakterien ihre Proteine ausschleusen.

Das Sec-System besteht aus den Proteinen SecA, SecB, SecD, SecE, SecF, SecG und SecY. Das tetramere Chaperon SecB (17 kDa) bindet ungefaltete Präproteine, welche eine N-terminale Signalsequenz aufweisen, im Zytoplasma und hält diese in einem exportfähigen Zustand, da ungefaltete Proteine ohne Tertiärstruktur effektiver exportiert werden als gefaltete (Beckwith 2013, Kudva *et al.* 2013). Der Komplex aus Präprotein und SecB bindet an SecA, welches sowohl löslich im Zytoplasma als auch gebunden an die Zytoplasmamembran - in Kontakt mit SecY, SecE und SecG - vorkommt (Beckwith 2013, Chatzi *et al.* 2013, Kudva *et al.* 2013). Das 100 kDa große Motorprotein SecA interagiert sowohl mit SecB als auch mit dem Sec-Kanal SecYEG und leitet das zum Export bestimmte Präprotein zu SecYEG hin (Beckwith 2013, Chatzi *et al.* 2013, Kudva *et al.* 2013). SecA ist eine ATPase, welche durch wiederholte Bindung und Hydrolyse von ATP die zur Translokation notwendige Energie bereitstellt. Zusätzlich wird der Translokationsprozess noch durch den Protonengradienten unterstützt (Kudva *et al.* 2013). SecY (48 kDa), SecE (14 kDa) und SecG (12 kDa) bilden als trimere Proteinkomplex in der Zytoplasmamembran die eigentliche Translokase. Dabei stabilisieren SecE und SecG das SecY, welches die öffnende Pore in der Zytoplasmamembran formt (Chatzi *et al.* 2013, Kudva *et al.* 2013). Der trimere Membranproteinkomplex SecDFyajC kommt mit SecY assoziiert vor, ist aber für den Proteinexport nicht essentiell. Womöglich handelt es sich bei SecDF um ein Chaperon, das die Proteintranslokation unterstützt sowie die Freisetzung des Proteins in das Periplasma erleichtert (Beckwith 2013, Chatzi *et al.* 2013, Kudva *et al.* 2013). Nachdem das Präprotein das Periplasma erreicht hat, wird seine N-terminale Signalsequenz von der an der Zytoplasmamembran lokalisierten Signalpeptidase I abgespalten (Stathopoulos *et al.* 2000, Chatzi *et al.* 2013). Eine typische Signalsequenz, welche durch das Sec-System erkannt wird, besteht aus 18 bis 30 Aminosäuren und weist eine positiv geladene N-Domäne, einen hydrophoben helikalen Kern (H-Domäne) sowie eine schwach polare C-Domäne auf, welche die Spaltstelle für die Signalpeptidase I enthält (Stathopoulos *et al.* 2000, Chatzi *et al.* 2013). Die A- sowie die B-Untereinheiten der Shigatoxine besitzen solche Signalpeptide (Scheutz *et al.* 2012). Das Signalpeptid der A-Untereinheit besteht bei Stx1a aus 22 Aminosäuren und das der B-Untereinheit aus 20 Aminosäuren (De Grandis *et al.* 1987, Jackson *et al.* 1987b). Die A-Untereinheiten

von Stx2a bzw. Stx2e besitzen ebenfalls ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid, während das Signalpeptid der B-Untereinheiten von Stx2a bzw. Stx2e nur 19 Aminosäuren lang ist (Jackson *et al.* 1987a, Tu *et al.* 2009). Zwar ist die Länge der Signalpeptide von Stx2a und Stx2e identisch, aber sie unterscheiden sich in einzelnen Aminosäuren (Weinstein *et al.* 1988b).

Neben dem Sec-System dient bei den Bakterien auch das TAT-System dem Export sekretorischer Proteine durch die Zytoplasmamembran (Kudva *et al.* 2013). Anders als bei der Sec-Translokase können durch TAT sogar bereits gefaltete Proteine transportiert werden. Das TAT-System besteht aus den drei Proteinen TatA, TatB und TatC, welche alle Bestandteile der Zytoplasmamembran sind. Bei Enterobacteriaceae existiert ein viertes Protein, TatE, das ein Paralog zu TatA darstellt und dieses funktionell ersetzen kann (Kudva *et al.* 2013). Typische TAT-Substrate sind Redoxproteine. Proteine, welche über das TAT-System ausgeschleust werden, verfügen über TAT-spezifische N-terminale Signalpeptide, die ein namensgebendes Argininpaar enthalten (Kudva *et al.* 2013). Entgegen der mehrheitlich vertretenen Ansicht, dass die Untereinheiten StxA und StxB einzeln via Sec-System in das Periplasma exportiert werden, sprechen Pradel *et al.* (2003) auch dem TAT-System eine wichtige Rolle für die Stabilität und die Sekretion von Stx zu. Sie beobachteten nämlich, dass der Stx-Titer von filtrierten Kulturüberständen des Wildtypstammes EDL 933 ( $stx_{1a}^+$ ,  $stx_{2a}^+$ ) im Verozell-Zytotoxizitätstest 1:4.096 betrug, während er bei filtrierten Kulturüberständen der *tatABC*-Deletionsmutante des gleichen Stammes 8-fach niedriger war (Titer von 1:512). Im gleichen Sinne war die StxA1-Bande der Deletionsmutante bei der Analyse der Kulturfiltrate im Immunoblot 5-mal schwächer ausgeprägt als beim Wildtyp. Bei einem *E. coli* K12-Stamm, der ein Plasmid mit dem Operon von Stx1a enthielt (pStx1AB), war die Stx-spezifische Verozell-Zytotoxizität im Periplasma sowohl bei dem Stamm mit intaktem *tatC* als auch im Periplasma der *tatC*-Deletionsmutante detektierbar, bei der Mutante jedoch um den Faktor 16 geringer. Da die Sphäroplasten beider K12-Stämme zytotoxisch für Verozellen waren, folgerten die Autoren, dass das Stx-Holotoxin-Molekül bereits im Zytoplasma vorhanden ist und möglicherweise über das TAT-System exportiert wird. Die Stx-Moleküle verfügen zwar nicht über eine TAT-spezifische Signalsequenz, doch sei bekannt, dass manche Proteine auch unabhängig von dieser Signalsequenz via TAT exportiert werden können (Pradel *et al.* 2003).

### **Freisetzung der Stx-Untereinheiten oder des Stx-Holotoxins in das umgebende Milieu**

Zur Ausschleusung von Proteinen über die äußere Membran hinweg stehen Gram-negativen Bakterien verschiedene Proteinsekretionssysteme (Typ I bis VI) zur Verfügung. Die Sekretion erfolgt entweder in einem einzigen, Sec-unabhängigen Schritt oder unter



Beteiligung der Sec-Translokase in zwei Schritten mit einer periplasmatischen Zwischenstufe (Sec-abhängig, sog. *general secretory pathway*, GSP) (Stathopoulos *et al.* 2000, Gerlach und Hensel 2007). Zu den Sec-unabhängigen Sekretionssystemen zählen der ABC-Transporter (Typ I-Sekretionssystem, T1SS), das Injektisom (Typ III-Sekretionssystem, T3SS), das Typ IV-Sekretionssystem (T4SS) und das Typ VI-Sekretionssystem (T6SS). Dagegen stellen das Typ II-Sekretionssystem (T2SS), der Autotransporter (Typ V-Sekretionssystem, T5SS) sowie das an der Sekretion von Pili beteiligte Chaperone/Usher-System verschiedene Mechanismen für den zweiten terminalen Schritt des GSP dar (Stathopoulos *et al.* 2000, Gerlach und Hensel 2007, Silverman *et al.* 2012).

Aktuell gibt es jedoch keinen schlüssigen Beleg dafür, dass Shigatoxine über eines der genannten Sekretionssysteme aus der Bakterienzelle freigesetzt werden (Kim *et al.* 2011). Das Vorhandensein eines Sekretionssystems für Shigatoxine wird immer wieder kontrovers diskutiert. Mainil erwähnt den von der Signalsequenz vermittelten Export von Stx in das Periplasma über ein Typ-II-Sekretionssystem, ohne dieses jedoch genauer zu beschreiben (Mainil 1999). Zuletzt postulierten Shimizu und Kollegen ein spezifisches Sekretionssystem für Stx2a, wobei ein Serinrest in der B-Untereinheit des Stx-Moleküls als Erkennungsmotiv für dessen Sekretion dienen soll (Shimizu *et al.* 2009). Der Serinrest befindet sich jeweils am carboxyterminalen Ende der ersten drei  $\beta$ -Faltblattstrukturen einer jeden StxB2a-Untereinheit (Shimizu *et al.* 2007). Die Untersucher wiesen in dem Stamm „E12“ das Stx2a nach der Transkription seiner Gene ausgehend vom Stx1-Promotor, der unabhängig vom Phagenzyklus durch Eisendepletion reguliert ist, intrazellulär nach. Der Stamm E12 ist ein Derivat des EHEC-Stammes EDL 933, bei dem *stx<sub>1a</sub>* deletiert wurde und dessen *stx<sub>2a</sub>*-Gen so kloniert wurde, dass es nur vom Stx1-Promotor ausgehend transkribiert werden kann [ $E(-2) \Delta stx1::stx2$ ]. Wie die Stx1a-Bildung beim Elternstamm so konnte auch bei dem Stamm E12 die Stx2a-Produktion gesteigert werden, wenn dieser unter Eisenmangel angezüchtet wurde. Dabei war Stx2a dann auch im Kulturüberstand vorhanden, obwohl keine Phagenvermittelte Lyse aufgetreten sein konnte. Stx2a, dessen Serinrest (Ser31) gentechnisch durch Asparagin (Asp31) ersetzt worden war, blieb dagegen auch unter Eisenmangel ausschließlich intrazellulär lokalisiert. Daraus folgerten die Autoren, dass es außer der Stx-Freisetzung durch Phagen-verursachte Bakterienzellyse noch ein spezifisches Transportsystem für Stx2a geben muss. Dabei handele es sich wahrscheinlich nicht um das Typ-II-Sekretionssystem, das von dem EHEC-Virulenzplasmid pO157 kodiert wird (Shimizu *et al.* 2009). Die steuernde Funktion des Ser31 interpretierten die Autoren auch als Ursache für das von ihnen beobachtete Phänomen, dass die Überexpression der Histidin-markierten StxB2a-Untereinheit in einem transformierten *E. coli*-Stamm die Stx2a-Sekretion inhibierte, obwohl die Stx2a-Gesamtproduktion anstieg (Shimizu *et al.* 2007). Auch Watarai *et al.* vermuteten einen

spezifischen Sekretionsmechanismus für Stx2, der ihrer Auffassung nach im Chromosom des Wirtsbakteriums kodiert ist und keine Eigenschaft des Phagen darstellt. Sie begründeten dies mit der Beobachtung, dass Stx2 im natürlichen *E. coli*-Lysogen des Phagen, also quasi in seinem originären bakteriellen Wirt, effizienter in den Kulturüberstand sezerniert wird als in *E. coli*-C600-Lysogenen des Phagen (Watarai *et al.* 1998).

Als gesichert gilt, dass Shigatoxine aus dem Inneren der Bakterienzelle (Zyto- oder Periplasma) durch eine Phagen-vermittelte Lyse des Bakteriums freigesetzt werden können (Makino *et al.* 1999, Wagner *et al.* 1999, Wagner *et al.* 2001a, Wagner *et al.* 2002, Ochoa *et al.* 2007, Łoś *et al.* 2010, McGannon *et al.* 2010). Dieser Mechanismus wird am häufigsten als Voraussetzung dafür postuliert, dass Stx im Kulturüberstand nachweisbar ist. Vieles spricht dafür, dass nicht nur die Expression der Stx-Gene vollständig (bei Stx2) oder zumindest stark (bei Stx1) von Genprodukten Stx-konvertierender Prophagen reguliert wird, sondern dass auch die Stx-Freisetzung in das umgebende Milieu von der Produktion spezifischer, lytischer Phagenproteine abhängt und mit dem Freiwerden von Bakteriophagenpartikeln korreliert ist (Wagner *et al.* 2001a, Wagner *et al.* 2002, Wagner und Waldor 2002). So wurde bei dem *E. coli*-K12-Lysogen MC1000(H-19B) Stx1a im Kulturüberstand nur dann nachgewiesen, wenn die Transkription des  $stx_{1a}$  vom späten Phagenpromotor  $p_R'$  ausging. War dagegen  $pStx1$  der dominante Promotor, blieb Stx1a fast ausschließlich in den Bakterienzellen lokalisiert. Die hier beobachtete zeitliche und räumliche Assoziation zwischen Stx1a-Freisetzung und Expression von Lysogenen des Bakteriophagen H-19B lässt vermuten, dass virale Lyseproteine im Freisetzungsprozess essentiell sind (Wagner *et al.* 2002). Die Autoren schließen jedoch eine Freisetzung von Stx *in vivo* über ein Typ II-Sekretionssystem oder infolge der Zerstörung von Bakterienzellen durch das wirtsseitige Immunsystem nicht ganz aus (Wagner *et al.* 2002). Aber auch Shigatoxine des Stx2-Typs bleiben intrazellulär lokalisiert, wenn bestimmte Elemente des Phagengenoms defekt sind (Tyler *et al.* 2004, Shimizu *et al.* 2009). So setzte das *E. coli*-Lysogen „K10599“, welches den intakten Wildtyp-Phagen 933W enthielt, auch ohne Stimulation mit MMC Stx2 in den Kulturüberstand frei. War dessen Phagenrepressor CI jedoch verändert und deshalb nicht mehr zu inaktivieren (*E. coli*-Lysogen „K10595“), dann war im Überstand kein Stx2 mehr nachweisbar (Tyler *et al.* 2004). In einer anderen Studie blieb Stx2 bei dem Stamm „E (SR)“ (= EDLAS-R), bei dem die Lysogene S und R des Stx2-Phagen 933W deletiert worden waren, intrazellulär lokalisiert (Shimizu *et al.* 2009). Allerdings wurde mit dem Western Blot nur das Protein der A-Untereinheit und nicht das Holotoxin detektiert.

Ein weiterer Mechanismus, mit dem Stx in das extrazelluläre Milieu gelangen kann, ist die Abschnürung von Membranvesikeln (MV), in welche periplasmatisches Stx inkorporiert ist (Kolling und Matthews 1999, Yokoyama *et al.* 2000a, Dutta *et al.* 2004). In MV des EHEC-

Stammes EDL 933 konnte mittels PCR *stx*<sub>1</sub>- und *stx*<sub>2</sub>-spezifische DNS nachgewiesen werden. In der gleichen Studie wurde in den MV-Präparationen von acht verschiedenen Stx1- und Stx2-produzierenden STEC-Stämmen zudem mittels Immunoblot eine Stx-spezifische Bande detektiert, welche auch nach der Behandlung intakter Vesikel mit Proteinase K nachweisbar blieb. Daraus wurde auf die Lokalisation von Stx in diesen MV geschlossen (Kolling und Matthews 1999). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Yokoyama *et al.* (2000a), welche die MV von insgesamt 46 STEC-Stämmen mit einem Immunoblot auf Stx1 und Stx2 untersuchten. Auch hier beeinträchtigte die Zugabe von Proteinase K zu den MV nicht die Detektion des Stx im Immunoblot. Die Behandlung der MV mit Polymyxin B führte zu einer Freisetzung von Stx aus den MV. Da bei allen untersuchten Stämmen (n = 46) eine Freisetzung von Stx1/Stx2 via MV stattfand, folgerten die Untersucher, dass die Abschnürung von MV bei STEC generell einen Mechanismus zur Abgabe von Stx darstellt. Donohue-Rolfe und Keusch (1983) nehmen an, dass Stx aufgrund seiner Lokalisation im Periplasma durch Bläschenbildung (sog. "bleb formation") der äußeren Membran freigesetzt werden könnte, ohne dass die Bakterienzelle dabei zerstört wird. Die Forschergruppe um Karmali *et al.* (1985) vermutet, dass eine zunehmende Durchlässigkeit der äußeren Bakterienmembran, welche ein passives Durchsickern von periplasmatischem Stx zur Folge hat, eine Ursache für das Auftreten von Stx im Kulturüberstand sein könnte. Eine aktive Sekretion von Stx aus dem Periplasma oder eine Stx-Freisetzung infolge bakterieller Autolyse schließen sie aus. Die Stx-Menge stieg nämlich nicht um den gleichen Faktor im Kulturüberstand an, um den sie in der Zelle vermindert vorlag und auch die Anzahl an vermehrungsfähigen Bakterienzellen nahm nicht ab (Karmali *et al.* 1985).

### **Lokalisation von Stx in der Bakterienkultur nach STEC-Anzucht unter Standardbedingungen**

Die laborexperimentellen Befunde zur subzellulären Lokalisation und Freisetzung von Shiga-toxinen aus ihrer Bakterienzelle sind widersprüchlich. Nach *in vitro*-Anzucht von STEC unter Standardbedingungen, d. h. ohne den Einfluss von spezifischen chemischen oder physikalischen Stressoren, ist es von Stamm zu Stamm verschieden, ob sich toxisch aktives Shiga-toxin vor allem zellassoziiert, d.h. im Zytoplasma und/oder im periplasmatischen Raum, oder vor allem im Kulturüberstand aufspüren lässt.

Bei *Shigella* (*S.*) *dysenteriae* ist das Stx nach Standardanzucht hauptsächlich intrazellulär im periplasmatischen Raum gespeichert (Donohue-Rolfe und Keusch 1983). Periplasma-Extrakte können aus *E. coli*-Bakterien durch gezielte Ruptur der äußeren Membran mit Polymyxin B gewonnen werden. Bei der Isolierung von Stx aus dem *S. dysenteriae* Typ 1-Stamm „R60“ mit Polymyxin B wurde zusätzlich zu Stx das periplasmatische Enzym 5'-

Nukleotidase (Cerny und Teuber 1971, Knöfel 2000) nachgewiesen, während der Anteil der zytoplasmatischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in diesem Extrakt nur maximal 2 % des Gehalts im Ganzzelllysate des gleichen Stammes betrug (Donohue-Rolfe und Keusch 1983). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die mit Polymyxin B hergestellten Extrakte tatsächlich vor allem die Inhaltsstoffe aus dem periplasmatischen Raum enthalten und auch Stx in diesem Raum angereichert ist. Die HeLa-Zell-zytotoxische Aktivität pro mg Protein („spezifische Zytotoxizität“) war bei diesen Polymyxin B-Extrakten 20- bis 30-mal größer als im Lysat des jeweils gleichen Stammes, das mittels French Press® durch hydrostatischen Druckabfall hergestellt worden war (Donohue-Rolfe und Keusch 1983). Die geringere spezifische Zytotoxizität der French Press®-Lysate kann dadurch erklärt werden, dass es sich hierbei eben um Ganzzelllysate handelte, die zusätzlich zum Stx noch weitere Proteine enthielten.

Das Stx1 der STEC lässt sich ebenfalls bevorzugt zellassoziiert nachweisen (O'Brien *et al.* 1982, Karmali *et al.* 1985, Marques *et al.* 1986, Shimizu *et al.* 2007). Bei den *E. coli*-Stämmen H.30 (O26:H11) und CL 40 (O157:H7) betrugen die Stx1-Titer (CD<sub>50</sub>/ml, ermittelt auf Verozellen) von Polymyxin B-Extrakten das 4- bzw. 8-Fache der Titer in den korrespondierenden Kulturüberständen (Karmali *et al.* 1985). In einer anderen Untersuchung enthielten die Bakterienzelleextrakte, die mittels French Press®-Aufschluss aus 9 *E. coli*-Stämmen gewonnen worden waren, eine zytotoxische Aktivität gegenüber HeLa-Zellen, welche mit anti-Stx-Serum zu neutralisieren war (O'Brien *et al.* 1982). Nur bei 2 Stämmen war diese Aktivität auch im Kulturüberstand nachweisbar (O'Brien *et al.* 1982). Shimizu und Kollegen wiesen Stx1 bei dem EHEC-Stamm „K24“ mit SDS-PAGE und Immunoblot ausschließlich zellassoziiert im Ultraschall-Lysatüberstand nach (Shimizu *et al.* 2007). Zusätzlich wurden weitere 53 EHEC-Stämme mit einem Gb3-ELISA auf ihre Stx1- und/oder Stx2-Bildung untersucht. Bei 16 von 17 Stämmen, bei denen ausschließlich Stx1 detektiert werden konnte, war der Stx1-Gehalt in der zellassoziierten Fraktion (Ultraschall-Lysatüberstand) höher als im Kulturüberstand. Auch bei allen 21 Stämmen, bei denen sowohl Stx1 als auch Stx2 detektierbar war, war die Menge an zellassoziiertem Stx1 größer als die Stx1-Menge im Kulturüberstand. Bei 3 Stämmen wurde Stx1 sogar ausschließlich zellassoziiert detektiert (Shimizu *et al.* 2007).

Anders als Stx oder Stx1 kann das Stx2 nach Standardanzucht entsprechender STEC-Stämme häufiger und in größeren Mengen im Überstand der Kultur nachgewiesen werden als zellassoziiert (Mainil 1999, Shimizu *et al.* 2007). Bei den EHEC-Stämmen „86-24“ (*stx*<sub>2a</sub><sup>+</sup>) und „EDL 933“ (*stx*<sub>1a</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>2a</sub><sup>+</sup>) wurde Stx2a mittels SDS-PAGE und Immunoblot ausschließlich im Kulturüberstand der beiden Stämme gefunden (Shimizu *et al.* 2007). Bei allen 15 EHEC-Stämmen, bei denen ausschließlich Stx2 detektiert werden konnte, war nach den Ergebnissen

im Gb3-ELISA deutlich mehr Stx2 im Kulturüberstand vorhanden als im Ultraschall-Lysat-überstand. Der prozentuale Anteil des im Kulturüberstand nachgewiesenen Stx2 betrug 51 - 98 % des insgesamt gebildeten Stx2 (Shimizu *et al.* 2007). Unter den 21 EHEC-Stämmen, bei denen sowohl Stx1 als auch Stx2 nachgewiesen werden konnte, war bei 20 Stämmen mehr Stx2 im Kulturüberstand vorhanden als im Ultraschall-Lysatüberstand. Der Anteil des freien Stx2 am Gesamt-Stx2 betrug 75 - 97 %. Nur bei einem Stamm war Stx2 mehr zell-assoziiert als frei im Nährmedium vorhanden (37 ng/ml gegenüber 30 ng/ml; Shimizu *et al.* (2007)).

Im Gegensatz zu vielen anderen Stx2-Subtypen wird das Stx2e vorwiegend als zell-assoziiertes Toxin beschrieben. Nach 24-stündiger Anzucht des STEC-2e-Stammes „412“, der aus einem an ED erkrankten Schwein isoliert worden war, fand man 95 % des gesamten Stx2e in der zellassoziierten Fraktion vor. Bei dem rekombinanten *E. coli*-Stamm „TB1 (pCG6)“, welcher das klonierte *stx<sub>2e</sub>*-Operon des Stammes „412“ enthielt, waren sogar 99 % des Stx2e in der Bakterienzelle lokalisiert (MacLeod und Gyles 1989). Dabei ist von einer periplasmatischen Lokalisation des Stx2e auszugehen, denn der Stx2e-Gehalt des Stammes TB1 (pCG6) - gemessen in  $CD_{50}$  pro  $\mu$ g Protein - war im Polymyxin B-Extrakt ca. 20-mal so groß wie im Bakterien-Ganzzelllysat (MacLeod und Gyles 1990). Das Polymyxin B wirkte in dieser Untersuchung mit 2 Stunden recht lang auf die Bakterien ein, so dass nicht ganz ausgeschlossen werden konnte, dass dies bereits das bakterielle Zytoplasma freisetzte. Polymyxin B greift zwar die äußere Membran von Bakterien an, aber es ist denkbar, dass bei längerer Einwirkzeit auch die Zytoplasmamembran rupturiert (Koch 1998). Bei den drei porcinen STEC-2e-Stämmen MVH 269, MVH 886 und ATCC 23546 (klinische Isolate von Schweinen, die an ED erkrankt waren) wurden mittels Verozell-Zytotoxizitätstest zell-assoziiert ebenfalls höhere Stx-Mengen gefunden als im Kulturüberstand (14.950, 26.726 bzw. 711  $CD_{50}$ /ml versus 129, 175 bzw. 15  $CD_{50}$ /ml) (Uemura *et al.* 2004). Marques *et al.* (1987) stellten bei dem aus einem an ED erkrankten Schwein isolierten EDEC-Stamm „S1191“ sogar eine 100-fach höhere Verozell-zytotoxische Aktivität im Ultraschall-Lysat-überstand als im Kulturüberstand fest.

Voraussetzung für die Detektion zytotoxischer Aktivität im Kulturüberstand scheint eine zumindest moderate Zytotoxizität [ $10^3$  -  $10^4$   $CD_{50}$ /ml] in der zellassoziierten Stx-Fraktion zu sein, denn nur bei Stämmen, die bei denen die Stx-Produktion anhand von zellassoziiertem Stx nachweisbar war, konnte Stx auch im Kulturüberstand gefunden werden (O'Brien *et al.* 1982, Karmali *et al.* 1985, Marques *et al.* 1986). In diese Richtung weisen auch die von Zhang *et al.* (2005) ermittelten Ergebnisse. Sie untersuchten die Kulturüberstände von 37 humanen STEC-Stämmen, die jeweils ein einziges *stx*-Operon besaßen: *stx<sub>2c</sub>* (9 Stämme), *stx<sub>2d</sub>* (16 Stämme) oder *stx<sub>2e</sub>* (12 Stämme). Bei 5 von 16 Stämmen des Genotyps *stx<sub>2d</sub>* bzw.

bei 1 von 12 Stämmen des Genotyps *stx<sub>2e</sub>* war im Kulturüberstand mittels Verozell-Zytotoxizitätstest kein Stx2d bzw. Stx2e zu detektieren. In den Polymyxin B-Extrakten der 5 *stx<sub>2d</sub>*-kodierenden Stämme war dagegen Stx2d mit dem Verozell-Zytotoxizitätstest bzw. mittels VTEC-RPLA nachweisbar, nicht jedoch im Polymyxin B-Extrakt des *stx<sub>2e</sub>*-kodierenden Stammes. Die Gehalte an *stxA*- und *stxB*-mRNA lagen bei allen sechs genannten Stämmen signifikant niedriger als bei denjenigen Stämmen, in deren Kulturüberständen Stx2c, Stx2d oder Stx2e enthalten war. Dies ließ insgesamt auf eine schwächere Toxinsynthese schließen und legte nahe, allein darin die Ursache für das Fehlen von Stx im Kulturüberstand zu sehen.

### **Lokalisation von Stx in der Bakterienkultur nach STEC-Anzucht in Anwesenheit von Stressoren**

Dutta *et al.* (2004) stellten nach Anzucht des *S. dysenteriae* Typ 1-Stammes „IBDM-1“ mit MMC einen Stx-Anstieg im Kulturüberstand, im Polymyxin B-Extrakt des Bakterienzellpellets sowie in den Membranvesikeln (MV) fest. Dabei war der Stx-Gehalt in den MV nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation signifikant höher als in den anderen untersuchten Fraktionen.

Eine Studie aus dem Jahr 1998 überprüfte die Effekte subinhibitorischer Dosen von 13 antimikrobiellen Wirkstoffen - der  $\beta$ -Laktame, der Sulfonamide und Trimethoprim, der Makrolide, der Epoxid-Antibiotika, der Aminoglykoside und der Chinolone - auf die Stx1- und/oder Stx2-Menge in den Kulturüberständen von drei EHEC-Stämmen der O-Gruppe O157 (*E. coli* 1193/89, Stx1<sup>+</sup>; *E. coli* 3574/92, Stx2<sup>+</sup>; *E. coli* 5768/87, Stx1<sup>+</sup>/Stx2<sup>+</sup>;(Grif *et al.* 1998)). Vier Substanzen ließen die Konzentration von Stx1 und/oder Stx2 bei allen drei untersuchten Stämmen ansteigen, 6 Wirkstoffe bei jeweils mindestens 2 der 3 Stämme. Drei Wirkstoffe führten jeweils nur bei einem der drei Stämme zum Anstieg der Stx-Konzentration. Der ausschließlich für Stx2 kodierende EHEC-Stamm war am leichtesten stimulierbar, da er auf 12 von 13 Wirkstoffen positiv reagierte. Unter den Wirkstoffen, die bei allen drei Stämmen zum Anstieg der Stx1/Stx2-Menge im Überstand geführt hatten, war auch Sulfamethoxazol-Trimethoprim vertreten. Bereits zuvor war die Auswirkung subinhibitorischer Dosen von Trimethoprim-Sulfamethoxazol bei den drei STEC-Stämmen *E. coli* 933, H30 und 240 sowie bei dem *S. dysenteriae* I-Stamm S31 nach 24-stündiger Anzucht untersucht worden und hatte sich im signifikanten Anstieg des Gesamt-Stx (Nachweis mit HeLa-Zell-Zytotoxizitätstest und anti-Stx-Antikörpern) gegenüber einer Anzucht ohne Zugabe der Substanz belegen lassen (Karch *et al.* 1986). Die von Grif *et al.* (1998) erhobenen Daten könnten somit nicht nur auf einer verstärkten Freisetzung, sondern auch auf einer gesteigerten Stx-Biosynthese beruhen. Auch Levofloxacin (*f. c.* 0,5 mg/ml), Fosfomycin (*f. c.* 25 mg/ml) oder Cefdinir (*f. c.* 4 mg/ml) können bei EHEC-Stämmen eine Erhöhung der Stx-Konzentration in deren Kulturüberständen bewirken. So war die Verozell-spezifische Zytotoxizität des Kulturüberstandes

nach Behandlung des EHEC-Stammes *E. coli* SS812 (O157:H7, *stx*<sub>1</sub><sup>+</sup> und *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>) mit jedem der drei Wirkstoffe signifikant größer als ohne Behandlung (Murakami *et al.* 2000). In einer anderen Untersuchung führte die Behandlung von drei STEC-Stämmen mit dem  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum Cefotaxim (50 % MHK) jedoch nur zu einem Anstieg von Stx1 in den Kulturfiltraten der Stämme, während die Stx2-Menge abnahm (Takahashi *et al.* 1997).

### **Korrelation der Stx-Freisetzung aus der Bakterienzelle mit der Produktion von Bakteriophagen**

Die bakterielle Shigatoxinproduktion ist bei Stx1 zu einem großen Teil und bei verschiedenen Stx2-Subtypen ausschließlich den regulativen Elementen des *stx*-kodierenden Bakteriophagen-genoms unterworfen (Wagner *et al.* 2001a, Wagner *et al.* 2002). Die Phagen-vermittelte Bakteriolyse stellt außerdem einen wichtigen Mechanismus dar, mit dem Stx1 und Stx2 aus der Bakterienzelle freigesetzt werden (Wagner *et al.* 2001a, Wagner *et al.* 2002). Daher ist bei der Induktion des jeweiligen *stx*-konvertierenden Bakteriophagen auch eine Steigerung der Stx-Bildung und -Freisetzung zu erwarten. Ist der betroffene Prophage intakt und in der Lage, seinen Replikationszyklus vollständig zu durchlaufen, dann befinden sich zusätzlich zu höheren Konzentrationen an freiem Stx vermehrt Bakteriophagenpartikel im Kulturüberstand des betreffenden STEC-Stammes.

Mehrere Forschergruppen konnten experimentell belegen, dass ein Antibiotikum in der Lage ist, nicht nur die Stx-Konzentration im Überstand des exponierten Stammes zu steigern, sondern gleichzeitig auch Stx-konvertierende Phagen zu induzieren (Matsushiro *et al.* 1999, Köhler *et al.* 2000, Muniesa *et al.* 2000, Ochoa *et al.* 2007). So prüften Köhler *et al.* (2000) den Einfluss von Carbadox, Olaquinox, Monensin, Tylosin und MMC auf die Menge an freiem Stx2 sowie auf das Auftreten von Stx2- bzw. Stx2e-konvertierenden Bakteriophagen bei den drei STEC-Stämmen *E. coli* 3538/95 (O157:H7, *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>), *E. coli* 5720/96 (O26:H-, *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>) und *E. coli* 2771/97 (ONT, *stx*<sub>2e</sub><sup>+</sup>). Nach der Behandlung mit Carbadox, Olaquinox oder MMC war die Anzahl an Stx2- bzw. Stx2e-konvertierenden Bakteriophagen in den Kulturüberständen bei allen drei Stämmen größer als in den Ansätzen ohne Behandlung. Der Phagentiter (PbE/ml) war dabei um den Faktor von bis zu  $3,88 \times 10^3$  angestiegen. Der Anstieg des Bakteriophagentiters wurde bei den Stx2-bildenden Stämmen von der Zunahme der Stx2-Menge im Kulturüberstand begleitet. Bei dem Stamm *E. coli* 2771/97 wurde die Zunahme des Phagentiters nicht in Bezug gesetzt zur Stx2e-Konzentration, da diese nicht bestimmt worden war. Muniesa *et al.* (2000) zeigten jedoch im gleichen Jahr, dass unter der Einwirkung von MMC (*f. c.* 0,5  $\mu$ g/ml) nicht nur die Stx2e-Konzentration anstieg, sondern auch der Stx2e-konvertierende Phage  $\phi$ P27 induziert wurde. Der Stx2e-Phagentiter im Kulturüberstand stieg dabei von  $10^2$  PbE/ml auf  $4,7 \times 10^8$  PbE/ml an. Gleichzeitig kam es

dort zum Anstieg der Stx2e-Konzentration auf das 50-Fache (Muniesa *et al.* 2000). Der *E. coli*-Stamm 2771/97 ist nach meiner Kenntnis der einzige Stx2e-kodierende STEC-Stamm in der Fachliteratur, der nachweislich einen intakten, induzierbaren *stx<sub>2e</sub>*-konvertierenden Phagen beherbergt.

Besonders häufig wird bei den Chinolon-Antibiotika über einen stimulierenden Effekt auf die Stx-Produktion sowie die Induktion von Bakteriophagen berichtet. So führte bei dem EHEC-Stamm RIMD 0509894 die Kokubation mit Norfloxacin (*f. c.* bis zu 1 µg/ml) für eine Dauer von 30 min zur Induktion der beiden Stx-konvertierenden Bakteriophagen VT1-Sa und VT2-Sa. Gleichzeitig stiegen die Konzentrationen von Stx1 und Stx2 im Kulturüberstand an, wobei Stx2 höhere Werte erreichte als Stx1 (Matsushiro *et al.* 1999). Ebenso ergab die Anzucht von 57 STEC-Stämmen (*stx<sub>1</sub>*<sup>+</sup> oder *stx<sub>2</sub>*<sup>+</sup> oder *stx<sub>1</sub>*<sup>+</sup>/*stx<sub>2</sub>*<sup>+</sup>) unter der Einwirkung von subinhibitorischen Ciprofloxacin-Konzentrationen bei allen Stämmen im Enzymimmunoassay signifikant höhere Mengen an extrazellulärem Stx als die Anzucht ohne Ciprofloxacin (Ochoa *et al.* 2007). Bei 40 Stämmen (70,2 %) wurde außerdem eine Ciprofloxacin-induzierte Bakteriolyse festgestellt, wobei in den filtrierten Kulturüberständen von 34 Stämmen (85 %) auch *stx*-kodierende Bakteriophagen vorhanden waren. Im Kulturüberstand der 40 Stämme, welche unter dem Einfluss von Ciprofloxacin lysierten, war die Stx-Konzentration signifikant höher als bei den 17 Stämmen ohne Bakteriolyse (Ochoa *et al.* 2007).

Granobles Velandia *et al.* (2012) überprüften 4 *stx<sub>2g</sub>*-kodierende STEC-Stämme von Rindern, nachdem sie parallel ohne und mit MMC-Zusatz angezüchtet worden waren. Bei allen vier Stämmen war die Stx2g-Konzentration in den Kulturüberständen nach Anzucht mit MMC 8- bis 16-mal so hoch wie nach Anzucht ohne MMC. Im Western Blot wurde eine Stx2-spezifische Bande nach Induktion mit MMC bei allen vier Stämmen detektiert. Dabei war die Stx2-Bande bei den zwei Stämmen mit induzierbaren Bakteriophagen stärker ausgeprägt als bei den beiden Stämmen, bei welchen MMC keine Bakteriophagen induzierte.

Bei dem EHEC-Stamm EDL 933 führte auch der Zusatz von NaCl zum LB-Medium (*f. c.* 2 %) zum Anstieg des mittels Western Blot nachgewiesenen Gehalts an Stx2A sowohl im Kulturüberstand als auch im Bakterienzellpellet, wenn die Proteinmenge auf die Anzahl lebender Bakterien normalisiert wurde (Harris *et al.* 2012). Gleichzeitig kam es bei der 2 %-igen NaCl-konzentration auch zur signifikanten Induktion des Stx2-kodierenden Phagen. Die Differenz zwischen der Höhe des im Plaquetest ermittelten Phagentiters (PbE/ml) und der Anzahl der mittels quantitativer real-time-PCR nachgewiesenen *stx<sub>2</sub>*-Genkopien ließ darauf schließen, dass neben dem Stx2-kodierenden Phagen noch weitere Bakteriophagen induziert wurden (Harris *et al.* 2012).



### 3 Material und Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sowie Puffer, Lösungen und Medien sind im Anhang aufgeführt.

#### 3.1 Bakterienstämme

##### 3.1.1 Kontrollstämme

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kontrollstämme sind in der **Tabelle 5** aufgeführt. Zu dieser Gruppe gehörten auch die 10 *stx*-negativen *E. coli*-Stämme, die aus den Kotproben von Schweinen isoliert worden waren und zur Bestimmung der Cut-Off-Werte (Stx2e-ELISA, Verozell-Zytotoxizitätstest) verwendet wurden.

**Tabelle 5: Verwendete Kontrollstämme**

Stammbezeichnung	IHIT-Nr.	ausgewählte Virulenzgene	Serotyp	Herkunft [Spezies & Erkrankung]	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> 031	x-0509/02	<i>stx</i> <sub>2b</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub>	O174:H21	M, SIDS	3
<i>E. coli</i> 412	x-0505/02	<i>stx</i> <sub>2e</sub> , <i>fedA</i>	O139:K82	S	3
<i>E. coli</i> 520	x-0510/02	<i>stx</i> <sub>2b</sub> <sup>†</sup>	ONT:H48	M, SIDS	3
<i>E. coli</i> 521	x-0511/02	<i>stx</i> <sub>2c</sub> <sup>†</sup>	ONT:H48	M, SIDS	3
<u><i>E. coli</i> 838/05</u>	k. A.	<i>fim41A</i>	n. t.	S	9
<u><i>E. coli</i> 987P</u>	x-0282/99	<i>fasA</i> , <i>estap</i>	O9:K103:H-	S	4
<i>E. coli</i> 2403	x-0269/99	<i>stx</i> <sub>1</sub> <sup>†</sup>	rough:H-	R	10
<i>E. coli</i> 2771/97	x-0657/05	<i>stx</i> <sub>2e</sub> , <i>estap</i>	ONT:H-	M, DI	1
<u><i>E. coli</i> 3848/03</u>	k. A.	<i>faeG</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O149:K91	S, DI	9
<i>E. coli</i> 4756/98	x-0502/02	<i>stx</i> <sub>1c</sub> <sup>†</sup> , <i>stx</i> <sub>2b</sub> <sup>†</sup>	O113:H4	M	2*
<i>E. coli</i> 5720/96	x-0672/05	<i>stx</i> <sub>2a</sub> <sup>†</sup>	O26:[H11]	M	2
<i>E. coli</i> Abbotstown	x-0237/99	<i>estap</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i> , <i>faeG</i> , <i>fasA</i>	O149:K91	S	4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	x-0383/01	k. A.	O6, Biotyp 1	M	7
<i>E. coli</i> B2F1	x-0495/02	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	O91:H21	M, HUS	5
<i>E. coli</i> B41	x-0281/99	<i>fanA</i> , <i>fim41A</i> , <i>estap</i>	O101:H-	S	4
<i>E. coli</i> BgVV97/00	x-0542/02	<i>stx</i> <sub>2f</sub>	k. A.	T	2*
<i>E. coli</i> C600	SS323	keine	K12	k. A.	2
<i>E. coli</i> DH5α	x-0556/03	keine	K12	k. A.	7
<i>E. coli</i> E57	x-0279/99	<i>stx</i> <sub>2e</sub> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i>	O138:K81	S	4

Fortsetzung der **Tabelle 5** auf der nächsten Seite

Stammbezeichnung	IHIT-Nr.	ausgewählte Virulenzgene	Serotyp	Herkunft [Spezies & Erkrankung]	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> EDL 933	x-0671/05	<i>stx</i> <sub>1a</sub> , <i>stx</i> <sub>2a</sub> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	O157:H7	M, HUS	8
<i>E. coli</i> EDL 933	x-0274/99	<i>stx</i> <sub>1a</sub> , <i>stx</i> <sub>2a</sub> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	O157:H7	M, HUS	2
<i>E. coli</i> EH250	x-0674/05	<i>stx</i> <sub>2b</sub>	ONT:H12	M, AK	2
<i>E. coli</i> EH250	x-0506/02	<i>stx</i> <sub>2b</sub>	O118:H12	k. A.	3
<i>E. coli</i> E32511	x-0507/02	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	O157:H-	M	3
<i>E. coli</i> E32511/HSC	x-0673/05	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	O157:H-	M	2
<i>E. coli</i> E32511/0	x-0286/99	<i>stx</i> <sub>2a</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub>	O157:H-	M	2
<i>E. coli</i> F107/86	x-0285/99	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	O139:K12:H1	S	6
<i>E. coli</i> Fac9/1	x-0498/02	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	ONT	S, ED	5
<i>E. coli</i> Fac9/2	x-0501/02	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	ONT	S, ED	5
<i>E. coli</i> GÖ15III	x-0284/99	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	O141:H85	S	9
<i>E. coli</i> H.I.8	x-0508/02	<i>stx</i> <sub>2f</sub>	O128:B12	M, DI	3
<i>E. coli</i> NV206/1	x-0500/02	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	O6:H10	R	5
<i>E. coli</i> NV206/2	x-0496/02	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	O6:H10	R	5
<i>E. coli</i> OX3:H11	x-0497/02	<i>stx</i> <sub>2b</sub> <sup>+</sup> , <i>stx</i> <sub>2c</sub> <sup>+</sup>	O174:H21	M, SIDS	5
<u><i>E. coli</i> P1766/01-1</u>	SS8094	<i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O138:K81	S, DI	9
<u><i>E. coli</i> P6180/00</u>	SS7627	<i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O147:K89	S, DI	9
<u><i>E. coli</i> P2672/04-2</u>	SS10456	keine	n. t.	S, DI	9
<u><i>E. coli</i> P929/01-1</u>	SS7998	<i>faeG</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O149:K91	S, DI	9
<u><i>E. coli</i> P3261/04-1</u>	k. A.	<i>faeG</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O149:K91	S, DI	9
<u><i>E. coli</i> P5670/04-3</u>	k. A.	<i>fanA</i> , <i>fim41A</i> , <i>estap</i>	n. t.	S	9
<u><i>E. coli</i> P0695/01-2</u>	SS7985	<i>fanA</i> , <i>estap</i>	O141:K85	S, DI	9
<i>E. coli</i> PH	x-0512/02	<i>stx</i> <sub>1a</sub> , <i>stx</i> <sub>2a</sub> , <i>stx</i> <sub>2b</sub> <sup>+</sup>	O111:H-	M, HUS	3
<i>E. coli</i> TTP-1	x-0276/99	<i>stx</i> <sub>1a</sub> <sup>+</sup> , <i>stx</i> <sub>2a</sub> <sup>+</sup> , <i>eae</i>	O157:H-	M	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	x-0549/03	k. A.	k. A.	M, Urin	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	x-0548/03	k. A.	k. A.	M, Blutkultur	7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	x-0550/03	k. A.	k. A.	M, Wunde	7

### Erläuterungen:

1 Prof. Dr. H. Schmidt, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim; 2 Prof. Dr. Dr. h. c. H. Karch, Institut für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität Münster \*über Dr. habil. P. Gallien, Umweltbundesamt, Dessau-Rosslau; 3 Dr. K. Ziebell, *Public Health Agency of Canada*, Guelph, Kanada; 4 Wray, C., *Central Veterinary Laboratory*, Addlestone, Großbritannien; 5 Dr. Y. Bertin, INRA, *Institut national de la recherche agronomique*, Clermont, Frankreich; 6 Dr. H. Imberechts, *Veterinary and Agrochemical Research Centre*, Brüssel, Belgien;

**7** Leibniz-Institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; **8** ATCC, *American Type Culture Collection*, Manassas, USA; **9** IHIT; Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Universität Gießen; **10** Wieler *et al.* (1992); **AK** Abdominale Krämpfe; **DI** Diarrhö; **ED** *Edema Disease*, Ödemkrankheit der Schweine; **Fac9/1** Phänotyp mit Hämolyse; **Fac9/2** Phänotyp ohne Hämolyse; **HUS** Hämolytisch-urämisches Syndrom; **k. A.** keine Angaben; **M** Mensch; **n. t.** mit den 7 ausgesuchten Seren nicht typisierbar; **NV206/1** Phänotyp mit dunklen Kolonien; **NV206/2** Phänotyp mit hellen Kolonien; **R** Rind; **S** Schwein; **SS** Stammsammlung; **SIDS** *Sudden Infant Death Syndrome*, plötzlicher Kindstod; **T** Taube.

Unterstrichene Stämme dienten der Bestimmung von Cut-Off-Werten (siehe **Kap. 3.1.3, 4.2 und 4.3.2**).

† Die Stx-Subtypisierung erfolgte im Nationalen Referenzlabor für Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (NRL VTEC) des Friedrich-Loeffler-Instituts, Jena.

### 3.1.2 STEC-2e-Feldstämme

Insgesamt wurden 365 porcine Stx2e-kodierende *E. coli* (STEC-2e)-Feldstämme auf ihr Stx2e-Bildungsvermögen unter Standardanzuchtbedingungen untersucht. Die Stämme waren über sieben Jahre (2000 bis 2006) in Schweine haltenden Betrieben im Bundesgebiet isoliert worden. Sie stammten von Schweinen verschiedener Altersgruppen, die unterschiedliche Krankheitssymptome zeigten. Alle Stämme waren im Rahmen des diagnostischen Dienstes am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (IHIT) mittels PCR auf das Vorkommen der Gene folgender Virulenzfaktoren untersucht worden: Stx2 und seine Subtypen inkl. Stx2e, Fimbrien F4, F5, F6, F18 und F41, *E. coli*-Enterotoxine ST-Ip, ST-II, LT-I sowie Intimin. Außerdem waren das Hämolyseverhalten auf Schafblutagar (BA) beurteilt und das Vorhandensein der O-Antigene 8, 138, 139, 141, 147, 149 und 157 geprüft worden.

Der Einfluss exogener Faktoren (Antiinfektiva, Mitomycin C und Bestrahlung mit UV-Licht) auf die basale Stx2e-Bildung von Feldstämmen (siehe **Kapitel 4.4**) wurde für eine unter den 365 ausgewählte Gruppe von Stämmen (n = 30) bestimmt. Diese Stämme sind in der **Tabelle 12** aufgeführt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass die bei den 365 Stämmen nachweisbaren Virulenzgene und O-Typen mit ungefähr der gleichen Häufigkeit unter den 30 Stämmen vertreten waren. Darunter befanden sich zehn typische EDEC-Stämme, welche Gene für Stx2e und F18-Fimbrien besaßen. Dazu kamen 11 EDEC/ETEC-Stämme, welche zusätzlich zu den EDEC-Virulenzgenen noch für mindestens ein *E. coli*-Enterotoxin kodierten. Bei 9 weiteren Stämmen, die in dieser Arbeit als sonstige STEC-2e bezeichnet werden, waren von den geprüften Virulenzgenen nur diejenigen für Stx2e nachweisbar.

### 3.1.3 Stämme zur Bestimmung von Cut-Off-Werten

Zur Bestimmung von Cut-Off-Werten für den Stx2e-ELISA und für den Verozell-Zytotoxizitätstest kamen zehn *stx*<sub>2e</sub>-negative *E. coli*-Stämme zum Einsatz (unterstrichene Stämme in der **Tabelle 5**).

### 3.1.4 Lagerung

Die Aufbewahrung der Bakterienstämme erfolgte als Glycerinkultur (LB-Medium mit 30 % Glycerin) bei -70 °C sowie in Stichagar (STA), welcher maximal dreimal subkultiviert wurde.

## 3.2 Zelllinien und deren Kultivierung

Bei der verwendeten Zelllinie handelte es sich um adhärenz Verozellen (ATCC # CRL-1587, LGC-Promocem GmbH, Wesel). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Plastik-Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit Filterdeckel im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung). Als Zellkulturmedium diente steriles RPMI 1640 mit L-Glutamin, dem 10 % hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (f. c. 100 IE/ml Penicillin bzw. 100 µg/ml Streptomycin) zugesetzt worden waren. Zur Zellernte für den Einsatz in Tests bzw. zur regelmäßigen Ausdünnung der Zellen vor der Weiterkultivierung wurden Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit 10 ml HEPES-Puffer entfernt. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin-Gebrauchslösung erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die auf diese Weise abgelösten Zellen wurden in ein Polypropylenröhrchen (CELLSTAR® 50 ml) überführt. Nachdem die Zellkulturflasche mit 10 ml RPMI-Medium ausgespült worden war, wurde diese Suspension zu der Zellsuspension im Polypropylenröhrchen hinzugefügt und zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 4K15C, Rotor Nr. 11150, 202 x g, 20 °C, 7 min). Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Verozellen in einer Neubauer-Zählkammer wurde ein Aliquot (20 µl) der Suspension 1:10 (v/v) mit Trypanblau-Lösung versetzt. Die für den jeweiligen Test erforderliche Zelldichte wurde anschließend durch Zugabe der jeweils adäquaten Menge an Medium eingestellt.

## 3.3 Antikörper

Im Sandwich-ELISA zur Bestimmung der Stx2e-Konzentration in Bakterienkulturen (Stx2e-ELISA) kamen kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper aus der Maus (Fa. Sifin Diagnostics GmbH, Berlin) zum Einsatz. Sowohl der Fang-Antikörper „SIFIN VT 136/8-H4“ (Charge 380705, kurz: VT 136/8-H4) als auch der Peroxidase-konjugierte Detektionsantikörper „SIFIN VT 135/6-B9“ (Chargen 250505 und 280407, kurz: VT 135/6-B9) sind laut Herstellerangaben gegen Stx2 gerichtet, wobei der Fang-Antikörper an die B-Untereinheit und der Detektions-Antikörper an die A-Untereinheit binden soll.

### 3.4 Kontrollantigene

In jedem Stx2e-ELISA wurden zur Normalisierung der OD-Werte zwei Lösungen mit rekombinantem Stx2e-Antigen (rStx2e) mitgeführt. Die verwendeten Toxinchargen waren mit rStx2e/01/05 und rStx2e/03/05 bezeichnet und dankenswerterweise von Frau Christiane Hoffmann (Hoffmann 2010) zur Verfügung gestellt worden. Für die Etablierung des Stx2e-ELISA (siehe **Kapitel 3.12.1**) wurde zusätzlich kommerziell erhältliches, aufgereinigtes Stx2 (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet.

### 3.5 UV-Licht, Mitomycin C und Antiinfektiva

Zur Untersuchung des Einflusses exogener Faktoren auf die Stx2e-Bildung porciner STEC-2e-Stämme *in vitro* wurden verschiedene Antiinfektiva ausgewählt. Diese sechs Antiinfektiva waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen für die Anwendung am Schwein zugelassen. Sie sind in der **Tabelle 6** aufgeführt. Zusätzlich wurde das zytostatische Antibiotikum Mitomycin C (*f. c.* 0,5 µg/ml) oder die Bestrahlung mit UV-Licht eingesetzt. Bei der Untersuchung auf Bakteriophagen diente das Fluorchinolon Norfloxacin (*f. c.* 0,5 µg/ml) als Referenzwirkstoff.

**Tabelle 6: Verwendete Antiinfektiva**

Antiinfektivum	Indikationen beim Schwein (Kroker 2003, Emmerich 2013)	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung <sup>2)</sup>
<b>Amoxicillin (AMX)</b>	respiratorische Infektionen, Magen-Darm-Infektionen	Na-Phosphatpuffer pH 6,0	2 mg/ml
<b>Colistin (COL) = Polymyxin E<sup>1)</sup></b>	Darminfektionen, Septikämien (ausgelöst durch <i>E. coli</i> und Salmonellen)	<i>A. demin.</i>	10 mg/ml
<b>Enrofloxacin (ENR)</b>	Diarrhö, Septikämien (jeweils ausgelöst durch <i>E. coli</i> )	<i>A. demin.</i> und 1 N NaOH	1 mg/ml
<b>Erythromycin (EM)</b>	respiratorische Infektionen, bakteriell bedingte Diarrhö und Dysenterien	EtOH abs. und <i>A. demin.</i>	20 mg/ml
<b>Neomycin<sup>1)</sup> (NEO)</b>	<i>E. coli</i> -bedingte Enteritis (nur orale Applikation zugelassen)	<i>A. demin.</i>	100 mg/ml
<b>Tetrazyklin (TC)</b>	Magen-Darm-Infektionen, andere lokale und systemische Infektionen	<i>A. demin.</i>	20 mg/ml

**Erläuterungen:** <sup>1)</sup> bevorzugter Einsatz bei der Ödemkrankheit der Schweine, <sup>2)</sup> abweichend von diesen Angaben wurde für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) die Stammlösung jedes Antiinfektivums auf eine Konzentration von 1.024 µg/ml eingestellt. **EtOH abs.** Ethanol, absolut (> 99 % Ethylalkohol). Lösungsmittel gemäß der „Durchführungsvorschriften für antimikrobielle

Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft“ des CLSI, Dokumente M31-A2 sowie M31-S1, 2. Ausgabe, 2002 (CLSI 2002)

### 3.6 Bakterienanzucht unter Standardbedingungen

#### Standard-Schüttelkultur

Bakterienstämme aus Glycerinkulturen oder Stichagar wurden zunächst auf Blutagarplatten (BAP) angezüchtet (aerob, 37 °C, 14 - 18 h). Bei Entnahme aus der Glycerinkultur wurde noch eine weitere Subkultivierung auf Blutagar vorgenommen. Die Standardanzucht als Schüttelkultur erfolgte in LB-Medium. Dazu wurden 3 - 4 Einzelkolonien des jeweiligen Stammes von der BAP abgenommen und in 2 ml LB-Medium inokuliert. Die Schüttelinkubation erfolgte im Schüttelbrutschrank (aerob, 180 rpm, 37 °C, 14 - 18 h).

#### Kultur zur Bestimmung der Stx2e-Konzentration

Ein Aliquot einer Standard-Schüttelkultur des jeweiligen Stammes wurde im Verhältnis 1:100 (v/v) in frisches LB-Medium überimpft (21 µl ad 2,1 ml LB-Medium). Danach erfolgte eine Bebrütung im Schüttelbrutschrank (aerob, 180 rpm, 37 °C, 5 h). Anschließend wurden die optische Dichte der Kultur bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt sowie der Überstand und die Bakterienzellfraktion der Kultur voneinander getrennt gewonnen (siehe **Kapitel 3.10**). Überstand und Zellfraktion wurden bis zur Bestimmung von Stx2e bei -70 °C gelagert.

### 3.7 Bakterienanzucht bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen und -zeiten

Um den Einfluss unterschiedlicher Bebrütungstemperaturen und -zeiten auf Wachstum und Stx2e-Bildung porciner STEC-2e-Stämme zu erfassen, wurden neun STEC-2e-Stämme jeweils bei 23 °C, 30 °C, 37 °C und 41 °C für insgesamt 24 h bebrütet. Die Stämme waren hierzu nach ihren Virulenzgenen und ihrer Herkunft aus der Grundgesamtheit der 365 Stämme ausgesucht worden. Zuerst erfolgte die Anzucht der Keime als Standard-Schüttelkultur (siehe **Kapitel 3.6**). Nach der Bestimmung der  $OD_{600}$  wurde die Kultur im Verhältnis 1/100 (v/v) in frisches LB-Medium überimpft und aerob bei 180 rpm und bei der jeweiligen Temperatur weiter inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 5 h und 24 h wurden die  $OD_{600}$  gemessen und Aliquots zur Ernte von Kulturüberständen und Bakterienzellen entnommen.

### **3.8 Bakterienanzucht unter dem Einfluss von UV-Licht, Mitomycin C oder Antiinfektiva**

Zur Exposition von STEC-2e-Stämmen gegenüber UV-Licht, Mitomycin C und Antiinfektiva wurde immer zuerst ein Aliquot einer Standard-Schüttelkultur des jeweiligen Stammes im Verhältnis 1:100 (v/v) in frisches LB-Medium überimpft (350 µl der Schüttelkultur ad 35 ml LB-Medium). Das resultierende Kulturvolumen betrug maximal 1/5 desjenigen Volumens, welches das Kulturgefäß (Erlenmeyer-Kolben) besaß. Die Kultur wurde im Schüttelbrutschrank bebrütet (aerob, 180 rpm, 37 °C) und in regelmäßigen Abständen auf ihre OD<sub>600</sub> geprüft. Sobald eine OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,4 erreicht war, wurde ein Aliquot der Kultur (2 ml) abgenommen, um darin die Stx2e-Konzentration vor einer Behandlung mit UV-Licht, Mitomycin C oder Antiinfektiva zu bestimmen („Nullwert“ von Stx2e). Dazu wurde der Kulturüberstand durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415C, 14.000 rpm, 10 min) gewonnen und bis zur Bestimmung der Stx2e-Konzentration bei -70 °C gelagert. Die nach Abnahme des Aliquots verbliebene Kultur (Testkultur) wurde in zwei Teile zu je 10 ml aufgeteilt, von denen ein Ansatz nicht behandelt wurde, der andere Ansatz dagegen mit UV-Licht behandelt oder mit Mitomycin C oder mit einem Antiinfektivum versetzt wurde. Unabhängig vom untersuchten Einflussfaktor wurden beide Ansätze für weitere 5 h inkubiert (aerob, 180 rpm, 37 °C). Danach wurde die OD<sub>600</sub> erneut gemessen. Vom behandelten Ansatz sowie vom nicht behandelten Parallelansatz wurden je ein Aliquot (2 ml) entnommen, um die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand nach 5 h zu bestimmen. Der Kulturüberstand wurde bis zur Quantifizierung von Stx2e bei -70 °C gelagert.

#### **3.8.1 UV-Licht**

Von den beiden Teilen der Testkultur (je 10 ml) wurde der nicht behandelte Ansatz direkt in ein Polypropylenröhrchen (CELLSTAR® 50 ml) gegeben. Der andere Ansatz wurde in eine Petrischale (Kunststoff, 92 x 16 mm) pipettiert und auf einem Leuchttisch (UV-Bildanalyse-Tisch) mit 312 nm-UV-Leuchtröhren für 30 s bestrahlt. Der behandelte Ansatz wurde anschließend in ein eigenes Polypropylenröhrchen (CELLSTAR® 50 ml) überführt und dieses bis zum Ende der Inkubationszeit zum Schutz vor weiterem Lichteinfall mit Alufolie umwickelt.

#### **3.8.2 Mitomycin C**

Die beiden Teile der Testkultur (je 10 ml) wurden in je ein Polypropylenröhrchen (CELLSTAR® 50 ml) überführt. Einem der beiden Ansätze wurde das zytostatische Antibiotikum Mitomycin C hinzugefügt (f. c. 0,5 µg/ml). Dem nicht behandelten Parallelansatz wurde das gleiche Volumen an LB-Medium zugesetzt.

### 3.8.3 Antiinfektiva

#### Exposition für 5 h

Die beiden Teile der Testkultur (je 10 ml) wurden in je ein Polypropylenröhrchen (CELLSTAR® 50 ml) überführt. Einem der beiden Ansätze wurde das zu untersuchende Antiinfektivum (siehe **Tabelle 6**) in derjenigen Dosis hinzugefügt, die der 100 %-igen minimalen Hemmkonzentration (MHK, siehe **Kapitel 3.9**) des Stammes entsprach. Der zweite Ansatz diente als nicht behandelter Parallelansatz. Ihm wurde das gleiche Volumen an Lösungsmittel zugesetzt, in dem der jeweilige Wirkstoff gelöst worden war (siehe **Tabelle 7**). Handelte es sich bei dem Lösungsmittel um *A. demin.*, wurde stattdessen LB-Medium zum nicht behandelten Ansatz gegeben. Betrug das pipettierte Volumen der antibiotischen Lösung bzw. des Lösungsmittels mehr als 1 % des Kulturvolumens, dem es zugesetzt werden sollte, so wurde zunächst das gleiche Volumen von der Kultur abgenommen und verworfen, das anschließend in Form der antibiotischen Lösung oder des Lösungsmittels wieder zugegeben wurde.

#### Exposition für 30 min

Zusätzlich zur 5-stündigen Anwesenheit der gewählten Antiinfektiva (siehe **Tabelle 6**) wurden eigene Testkulturen der STEC-Stämme auch kurzfristig für 30 min mit Norfloxacin bzw. Enrofloxacin behandelt. Die Vorgehensweise entsprach bis zum Aufteilen der Testkultur in zwei Ansätze zu je 10 ml derjenigen bei 5-stündiger Exposition. Die Zugabe der Antiinfektiva (f. c. 1 µg/ml) erfolgte dann aber nur für eine Dauer von 30 min (aerob, 180 rpm, 37 °C). Danach wurden die Kulturen sofort zentrifugiert (Zentrifuge 5804R, 4500 x g, 5 min) und der Überstand abgenommen. Das Bakterienpellet wurde unmittelbar in 10 ml frischem LB-Medium resuspendiert und mit dem Vortex-Gerät durchmischt. Danach wurde diese Suspension für weitere 5 h (aerob, 180 rpm, 37 °C) bebrütet.



**Tabelle 7: Behandlung von Bakterien mit Antiinfektiva, Mitomycin C und Norfloxacin bzw. mit dem jeweiligen Lösungsmittel**

	zugesetzte Substanz	
	behandelter Ansatz	nicht behandelter Ansatz
<b>Amoxicillin</b>	Amoxicillin gelöst in Na-Phosphatpuffer pH 6,0	Na-Phosphatpuffer pH 6,0
<b>Colistin</b>	Colistin gelöst in <i>A. demin.</i>	LB-Medium
<b>Enrofloxacin</b>	Enrofloxacin gelöst in ½ Volumen <i>A. demin.</i> , Zugabe von 100 µl 1 N NaOH, dann Zugabe von <i>A. demin.</i> ad Endvolumen	LB-Medium
<b>Erythromycin</b>	Erythromycin gelöst in ½ Volumen EtOH abs., dann Zugabe von <i>A. demin.</i> ad Endvolumen	EtOH abs. verdünnt in <i>A. demin.</i> im Verhältnis 1:1 (v/v)
<b>Mitomycin C</b>	Mitomycin C gelöst in <i>A. demin.</i>	LB-Medium
<b>Neomycin</b>	Neomycin gelöst in <i>A. demin.</i>	LB-Medium
<b>Norfloxacin</b>	Norfloxacin gelöst in Eisessig	Eisessig verdünnt in LB-Medium, Endkonzentration von Eisessig ( <i>f. c.</i> ) wie im Ansatz mit Norfloxacin
<b>Tetrazyklin</b>	Tetrazyklin gelöst in <i>A. demin.</i>	LB-Medium

**Erläuterungen:** **EtOH abs.** Ethanol, absolut (> 99 % Ethylalkohol). Lösungsmittel gemäß „Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft“ des CLSI, Dokumente M31-A2 sowie M31-S1, 2. Ausgabe, 2002 (CLSI 2002)

### 3.9 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antiinfektiva und Mitomycin C

Um die Auswirkung von Antiinfektiva auf die Shigatoxin-Bildung zu untersuchen, wurde die entsprechende Substanz in ihrer jeweils minimalen bakteriostatischen Hemmkonzentration (MHK) eingesetzt. Dazu wurden mit Ausnahme von Norfloxacin die MHKs der verwendeten Antiinfektiva (siehe **Tabelle 6**) sowie von Mitomycin C (MMC) an den 30 ausgewählten STEC-2e-Stämmen (siehe **Tabelle 12**) und an den *E. coli*-Kontrollstämmen EDL 933, 2771/97, 987P und B41 bestimmt. Hierzu wurde die Bouillon-Mikrodilutionsmethode gemäß den „Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft“ des CLSI (Dokumente M31-A2 sowie M31-S1, 2. Ausgabe, 2002) angewendet (CLSI 2002). Es handelt sich dabei um einen im Mikrotiterplattenformat durchgeführten Reihenverdünnungstest. Der antimikrobielle Wirkstoff liegt in unterschiedlichen Konzentrationen im Nährmedium vor und wird mit standardisierten Inokula des auf seine Empfindlichkeit zu prüfenden Keims beimpft. Nach erregerabhängiger Bebrütungsdauer erfolgt die visuelle Auswertung. Dabei gilt jene

Konzentration des Wirkstoffs, bei der mit bloßem Auge gerade kein Bakterienwachstum mehr erkennbar ist, als minimale Hemmkonzentration (Hübner NO 2007). Jeder zu testende Stamm wurde zuerst auf Blutagar angezüchtet und dieser aerob bei 37 °C für 18 - 24 h bebrütet. Die Stammlösung jedes Antiinfektivums wurde auf eine Konzentration von 1.024 µg/ml eingestellt. Dabei wurden die empfohlenen Lösungs- und Verdünnungsmittel gemäß CLSI benutzt (siehe **Tabelle 7**). Die Antibiotika-Gebrauchslösung wurde mit Mueller-Hinton-Bouillon (MHB) auf eine Konzentration von 512 µg/ml eingestellt. Die Belegung der Mikrotiterplatten (96-U, steril, Fa. Nunc) ist in **Abbildung 1** dargestellt.

Endkonzentration des Antiinfektivums in jeder Kavität der Spalten 1 bis 12 [µg/ml]												
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Keim 1											
B												
C	Keim 2											
D												
E	Keim 3											
F												
G	n. b.							MHB-AB		n. b.	MHB	
H	W1		W2		W3			n. b.				

**Abbildung 1: Belegung der 96-Loch-Mikrotiterplatten zur MHK-Bestimmung**

**Erläuterungen:** **A-H** Reihen, **1 - 12** Spalten der Mikrotiterplatte; **MHB** Mueller-Hinton-Bouillon;  
**MHB-AB** Gebrauchslösung des Antiinfektivums [512 µg/ml];  
**n. b.** nicht belegt; **W1 - W3** Wachstumskontrollen der Keime Nr. 1 bis 3

Zuerst wurden in jede Kavität der Spalten 2 bis 12 von Reihe A bis F je 100 µl MHB vorgelegt, ebenso in die Kavitäten der Spalten 1 bis 6 der Reihe H. In die Kavitäten der Spalten 11 und 12 der Reihe G wurden je 200 µl MHB pipettiert, dies diente zur Kontrolle des Mediums auf Sterilität. In die Kavitäten der Spalten 8 und 9 der Reihe G wurden je 100 µl MHB und 100 µl der Stammlösung des Antiinfektivums pipettiert, um die Sterilität der Stammlösung zu überprüfen. Anschließend wurden je 100 µl der Gebrauchslösung des Antiinfektivums in die Kavitäten der Spalten 1 und 2 der Reihen A bis F gegeben. Von Spalte 2 bis Spalte 12 wurde dann eine  $\log_2$ -Verdünnungsreihe des Antiinfektivums in Mueller-Hinton-Bouillon hergestellt. Dadurch lag der Wirkstoff zunächst in Konzentrationen von 0,25 bis 512 µg/ml vor. Durch die Zugabe von 100 µl Bakteriensuspension (Inokulum) zu jeder dieser Kavitäten wurden die Endkonzentrationen von 0,125 bis 256 µg/ml erzielt. Abweichend davon wurden bei Enrofloxacin Wirkstoffkonzentrationen von 0,004 bis 8 µg/ml eingestellt, da die MHK-Werte von Enrofloxacin bei STEC-2e-Stämmen durch den ansonsten verwendeten Konzentrationsbereich nicht abgedeckt wurden. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden von dem zu prüfenden STEC-2e-Stamm 3 - 5 Kolonien einer Reinkultur von Blutagar abgenommen und in 5 ml sterile 0,89 %-ige NaCl-Lösung überführt. Die Trübung wurde so eingestellt, dass sie einem Wert von 0,5 der McFarland-Skala entsprach. Danach wurden 50 µl dieser Lösung mit 11 ml steriler MHB homogen gemischt. Pro Kavität wurden 100 µl dieser Suspension zum vorgelegten Wirkstoff-Medium-Gemisch pipettiert, beginnend bei der niedrigsten Konzentration des Wirkstoffs aufsteigend bis zur höchsten Konzentration. Die Kavitäten für die Wachstumskontrolle jedes Stamms wurden zuerst belegt. Die Herstellung der Inokula in Abhängigkeit von der Bakteriengattung bzw. -spezies ist in **Tabelle 8** aufgeführt.

**Tabelle 8:** Herstellung von Inokula für die MHK-Bestimmung gemäß „Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft“ des CLSI, Dokumente M31-A2 sowie M31-S1, 2. Ausgabe, 2002 (CLSI 2002)

Bakterienspezies	Anzahl an Kolonien	Volumen der 0,89 %-igen NaCl-Lösung [ml]	Herstellung des Inokulums
<i>E. coli</i> und <i>Pseudomonas</i> spp.	3 - 5	5	50 µl in 11 ml MHB
<i>Staphylococcus</i> spp.	4 - 5	5	100 µl in 11 ml MHB
<i>Enterococcus</i> spp.	5 - 10	2,5	200 µl in 11 ml MHB

**Erläuterungen:** MHB Mueller-Hinton-Bouillon. Es wurden Kolonien mittlerer Größe ausgewählt.

Die Mikrotiterplatten wurden aerob im Brutschrank bei 35 °C für 18 - 24 h inkubiert. Danach wurde der Test unter Zuhilfenahme eines Mikrotiterplatten-Spiegels visuell ausgewertet. Zuerst wurden die Kavitäten mit den Sterilkontrollen von MHB und Antiinfektivum-Lösung kontrolliert. Sie mussten klar sein, damit der Test ausgewertet werden konnte. Anschließend wurde für jeden Stamm diejenige Wirkstoffverdünnung bestimmt, in der gerade keine Trübung des Wirkstoff-Medium-Gemischs mehr erkennbar war. Die Wirkstoffkonzentration dieser Spalte entsprach der MHK des betreffenden Wirkstoffs für den getesteten Bakterienstamm. Dabei wurde jeder Stamm mit seiner Wachstumskontrolle verglichen. Wichen die Ergebnisse des Doppelansatzes voneinander ab, wurde die höhere MHK gewertet. Die Grundlage für die Einstufung eines Stammes als sensibel, intermediär bzw. resistent bildeten die Angaben (*breakpoints*) der AVID-Methodensammlung „Resistenzbestimmung“, Tabelle 2, Lieferung XII/2000 (AVID 2000), außer bei Erythromycin und Tetrazyklin, bei denen die Dokumente M31-A2 und M31-S1 des CLSI (CLSI 2002) herangezogen wurden. Zur Bewertung der humanen *E. coli*-Kontrollstämmen EDL 933 und 2771/97 wurde auf die Angaben von EUCAST (EUCAST 2013) bzw. des CLSI (2015) zurückgegriffen (siehe auch **Tabelle 19** und **Tabelle 20**).

Jedes Inokulum wurde auf Reinheit und korrekte Keimdichte (Ziel:  $5 \times 10^5$  KBE/ml) überprüft. Dazu wurden 10 µl des Inokulums auf Blutagar ausgestrichen und außerdem weitere 10 µl in 10 ml sterile 0,89 %-ige NaCl-Lösung überführt. Nach Durchmischen dieses Ansatzes wurden 100 µl davon auf eine frische Blutagar-Platte ausgespatelt. Die Blutagar-Platten zur Kontrolle von Reinheit und Keimdichte wurden aerob im Brutschrank bei 35 °C für 18 - 24 h inkubiert. Falls eine Kontamination auftrat oder die erforderliche Keimdichte nicht erreicht wurde, musste der Test wiederholt werden.

Bei jedem antimikrobiellen Wirkstoff wurden einmal pro Versuchswoche die Kontrollstämmen *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29123, *E. faecalis* ATCC 29212 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 mitgeführt (siehe **Tabelle 5**). Die MHK-Werte dieser Stämme mussten innerhalb der in der Durchführungsvorschrift vorgegebenen Grenzen liegen. War dies nicht der Fall, mussten die in der betreffenden Woche durchgeführten Tests wiederholt werden.

### 3.10 Gewinnung von Stx2e aus Bakterienkulturen

#### 3.10.1 Gewinnung von Kulturüberständen

Von jeder Bakterienkultur, deren Stx2e-Konzentration bestimmt werden sollte, wurde ein Aliquot der Kultur (2 ml) entnommen und zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415C, 14.000 rpm, 10 min). Der dabei von den Bakterienzellen getrennte Kulturüberstand wurde mittels Pipette abgenommen und bei -70 °C bis zur Quantifizierung des Stx2e gelagert. Das im Kulturüberstand enthaltene Stx2e stellt das freie, sezernierte Stx2e dar.

### 3.10.2 Gewinnung von Stx2e durch Bakterienzellaufschluss

Die beiden nachfolgend erläuterten Lyseverfahren dienen der Gewinnung von zellassoziertem Stx2e. Dieses umfasst das intrazytoplasmatisch und das periplasmatisch vorhandene Stx2e.

#### Ultraschall-Lyse

Das nach Abnahme des Kulturüberstands verbliebene Bakterienpellet wurde in steriler physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert (gleiches Volumen wie der zuvor abgenommene Kulturüberstand). Die Ultraschallbehandlung (Ultraschallgerät Branson Sonifier, Einstellung Stufe 4 - 5) erfolgte zweimal nach folgendem Zyklus: Beschallung der Probe für 20 s, 20 s Pause mit Lagerung der Probe auf Eis, 20 s Beschallung, 60 s Pause mit Lagerung auf Eis. Nach dieser Behandlung wurde das entstandene Lysat zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415C, 14.000 rpm, 10 min), der Überstand abgenommen (Ultraschall-Lysatüberstand, US-Lysatüberstand) und bei -70 °C bis zur Bestimmung der Stx2e-Konzentration gelagert.

#### Lyse mit BugBuster® Protein Extraction Reagent

Das nach Abnahme des Kulturüberstands verbliebene Bakterienpellet wurde in 1/5 des Ausgangskulturvolumens BugBuster®-Gebrauchslösung (bestehend aus BugBuster® 1 x Protein Extraction Reagent, rLysozyme™ Solution, f. c. 1 kU/ml und Benzonase® Nuclease, f. c. 25 U/ml) resuspendiert. Dies entsprach der Empfehlung des Herstellers. Danach erfolgte eine Inkubation (Über-Kopf-Schüttler, RT, 15 min) mit anschließender Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415C, 14.000 rpm, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen (BugBuster®-Lysatüberstand, BB-Lysatüberstand) und bei -70 °C bis zur Bestimmung der Stx2e-Konzentration gelagert.

### 3.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurde mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ nach der „Bicinchoninic-Acid (BCA)“-Methode zur kolorimetrischen Bestimmung und Quantifizierung von Proteinen bestimmt. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

### 3.12 Quantitativer Nachweis von Stx2e

Die in Kulturüberständen und Bakterienlysaten vorhandene Konzentration an Stx2e wurde mit dem Stx2e-ELISA und/oder mit dem Verozell-Zytotoxizitätstest quantifiziert.

#### 3.12.1 Stx2e-ELISA

##### Durchführung

Nach der Beschichtung einer Mikrotiterplatte (U-96 Polysorp, Fa. Nunc) mit dem Fangantikörper „SIFIN VT 136/8-H4“/100 µl/Kavität in Coating-Puffer (Inkubation bei RT über 14 - 16 h in der feuchten Kammer) und dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen (100 µl Blockpuffer 1:10 in *A. demin.*/Kavität, 37 °C, 1 h) wurden die entsprechenden Vertiefungen im Einfachansatz mit dem Probenmaterial belegt und bei Bedarf gemäß einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe verdünnt (100 µl/Kavität, RT, 1 h). Dann erfolgte die Zugabe des Peroxidase (POD)-markierten Detektionsantikörpers „SIFIN VT 135/6-B9“ (1:1.500 v/v in PBS-Tween, 100 µl/Kavität, RT, 1 h). Zwischen allen Schritten wurde jede Vertiefung der Platte fünfmal mit je 300 µl PBS-Tween gewaschen. Nach der Inkubation mit dem Detektionsantikörper wurde jede Vertiefung sechsmal in analoger Weise gewaschen. Der Nachweis der an Stx2e gebundenen Detektionsantikörper erfolgte durch Zugabe von POD-Substrat (TMB-Reagenz, 100 µl/Kavität, lichtgeschützt, RT, 15 min). Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl/Kavität 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Stopplösung) beendet. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte in einem Plattenphotometer (Fa. Multiskan Ascent Labsystems) durch Differenzmessung mit der Testwellenlänge OD<sub>450</sub> und der Referenzwellenlänge OD<sub>620</sub> ( $OD = OD_{450} - OD_{620}$ ). Als Kontrollantigene wurden auf jeder Platte jeweils im Doppelansatz die folgenden rStx2e-Chargen mitgeführt: „rStx2e/01/05“ (Verdünnungen 1:8.192, 1:16.384, 1:32.768 in PBS-Tween) und „rStx2e/03/05“ (Verdünnungen 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096 und 1:8.192 in PBS-Tween). Um die Hintergrundfärbung des jeweiligen Tests zu ermitteln („Substratkontrolle“), wurde eine mit dem Fangantikörper beschichtete Kavität in allen Schritten ausschließlich mit PBS-Tween belegt. Ihr wurde am Schluss nur das Substrat TMB sowie die Stopplösung zugegeben.

##### Auswertung

Für einen validen Test musste der Messwert der rekombinanten Stx2e-Charge „rStx2e/03/05“ in der Verdünnungsstufe 1:2.048 zwischen 0,5 und 2,0 liegen und der Messwert der Substratkontrolle unter 0,075. Wurden diese Anforderungen nicht erfüllt, wurde der Test wiederholt. Bei Mehrfachansätzen wurden die OD-Messwerte der identischen Ansätze arithmetisch gemittelt. Die Stx2e-Konzentration wurde danach auf drei verschiedene Weisen berechnet:

### 1. Berechnung der Stx2e-Konzentration als relative optische Dichte [OD %]

Dazu wurde die gemessene OD der Probe auf die OD des Kontrollantigens rStx2e/03/05 in der Verdünnungsstufe 1:2.048 (= 100 %) normalisiert. Zuvor wurde der OD-Wert der Substratkontrolle von den OD-Werten der Probe und des Kontrollantigens subtrahiert:

$$\text{Stx2e-Konzentration [OD \%]} = \frac{[\text{OD (Probe)} - \text{OD (Substratkontrolle)}] \times 100}{\text{OD (rStx2e/03/05, 1:2.048)} - \text{OD (Substratkontrolle)}}$$

### 2. Bestimmung der Stx2e-Konzentration im logarithmischen System ( $\log_2$ -Stx2e-Titer)

Die Proben (Kultur- und Lysatüberstände) wurden in einer  $\log_2$ -Verdünnungsreihe im Stx2e-ELISA eingesetzt und ihre Stx2e-Konzentration nach dem Prinzip der Endpunkt-titration ermittelt. Zur Beurteilung einer Verdünnungsstufe als positiv bzw. negativ dienten spezifische Cut-Off-Werte (44,70 OD % für Kulturüberstände bzw. 25,23 OD % für Lysatüberstände, siehe **Tabelle 15**). Als  $\log_2$ -Stx2e-Titer wurde der reziproke Wert der höchsten Verdünnungsstufe definiert, in welcher die betreffende Probe gemäß dieses Cut-Offs gerade noch als positiv beurteilt wurde.

### 3. Bestimmung der Stx2e-Konzentration im nicht-logarithmischen System (nlog-Stx2e-Titer)

Eine präzise Differenzierung der gebildeten Stx2e-Menge war bei Stämmen, bei denen im Endpunkttitrationsverfahren identische  $\log_2$ -Stx2e-Titer ermittelt worden waren, nicht möglich. Um die Stx2e-Bildung solcher Stämme zu vergleichen, wurde deren Stx2e-Konzentration im nicht-logarithmischen System als nlog-Stx2e-Titer aus dem Produkt der relativen optischen Dichte und dem  $\log_2$ -Stx2e-Titer nach der folgenden Formel erneut berechnet:

$$\text{nlog-Stx2e-Titer [OD \%]} = \text{Stx2e-Konzentration [OD \%]} \times \log_2\text{-Stx2e-Titer}$$

Verwendet wurden dabei derjenige  $\log_2$ -Stx2e-Titer und diejenige Stx2e-Konzentration der höchsten Verdünnungsstufe, in der die jeweilige Probe gemäß Cut-Off gerade noch als positiv beurteilt werden konnte. Bei Stämmen, die einen anderen Stx2-Subtyp als Stx2e bilden, wurde der nlog-Titer analog berechnet und in der Titerbezeichnung der Subtyp Stx2e durch den Subtyp des jeweiligen Stammes ersetzt (Bsp.: Beim Referenzstamm EDL 933 heißt es nlog-Stx2a-Titer).

### 3.12.2 Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT)

#### Prinzip und Durchführung

Der Gehalt von biologisch aktivem Stx2e in Kultur- und Lysatüberständen von *E. coli*-Kulturen wurde durch die Ermittlung der für Verozellen zu 50 % zytotoxischen Dosis ( $CD_{50}/ml$ ) mittels Endpunkttitration bestimmt.

Der Test wurde jeweils im Dreifachansatz in F96-Mikrotiterplatten (96-F, steril, Fa. Nunc) durchgeführt. Die fraglichen Proben wurden dazu in steriler NaCl-Lösung (0,89 %) in  $\log_{10}$ - oder  $\log_2$ -Verdünnungsstufen (50  $\mu l$ /Kavität) titriert. Als Positivkontrolle diente 1 %-ige SDS-Lösung und als Negativkontrolle sterile NaCl-Lösung (jeweils 50  $\mu l$ /Kavität). Im Anschluss wurden  $4 \times 10^4$  Verozellen in 100  $\mu l$  Zellkulturmedium in jede Kavität pipettiert. Bei jedem Test wurden die äußersten Vertiefungen der Platten mit jeweils 100  $\mu l$  steriler NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz beschickt. Dann wurden die Platten für 96 h inkubiert (5 %  $CO_2$ -Atmosphäre, 37 °C).

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen zuerst visuell mittels Inversmikroskop auf zytopathische Effekte kontrolliert. Dies diente der Plausibilitätskontrolle der später errechneten zytotoxischen Aktivität ( $CD_{50}/ml$ ). Anschließend wurde der kolorimetrische MTT-Test in der Modifikation von Tada *et al.* (1986) durchgeführt. Dazu wurde der Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu jedem Reaktionsansatz gegeben (25  $\mu l$  MTT-Lösung/Kavität) und die Platten für 4 h bei 37 °C auf einer Wippe (136 Bewegungen/min) inkubiert, um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs zu erzielen. Das MTT (gelb) dringt in die Zellen ein, worauf sein Tetrazoliumring durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen und zu Formazan (dunkelblau) umgesetzt wird. Nach Ablauf der 4-stündigen Einwirkzeit wurde 10 %-ige SDS-Lösung (100  $\mu l$ ) in jede Kavität hineingegeben und die Platte für weitere 18 - 20 h bei gleichen Bedingungen (136 Bewegungen/min, 37 °C) inkubiert, um die Reaktion abzustoppen sowie die gebildeten Formazankristalle zu lösen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) jeder Kavität mit einem Plattenphotometer (Fa. Multiskan Ascent Labsystems) durch Differenzmessung bei der Testwellenlänge  $OD_{540}$  und der Referenzwellenlänge  $OD_{690}$  ( $OD = OD_{540} - OD_{690}$ ). Die optischen Dichten der Positiv- und Negativkontrollen ( $OD_{pos}$  bzw.  $OD_{neg}$ ) wurden analog ermittelt.

#### Auswertung

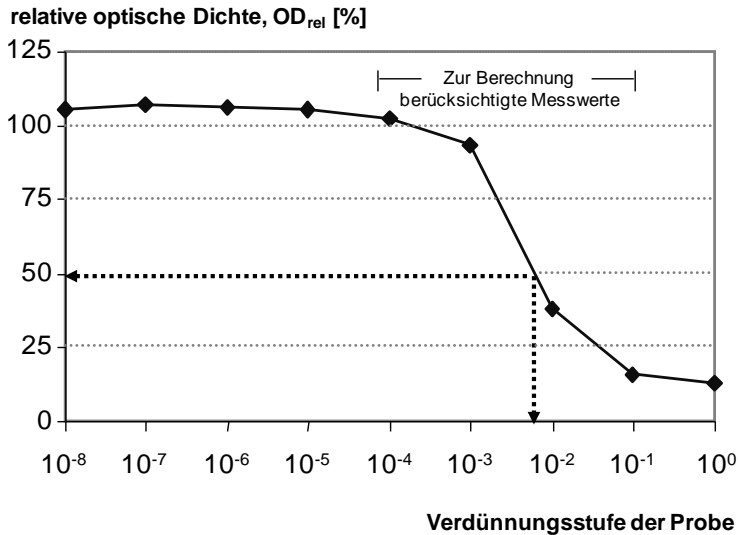
Die Messwerte der in gleicher Weise angesetzten Ansätze (sog. Mehrfachansätze) wurden arithmetisch gemittelt ( $OD_{abs}$ ). Die auf jeder Platte mitgeführten Positiv- und Negativ-



kontrollen dienten der Normalisierung der Messwerte von Proben. Dabei wurde die relative optische Dichte einer Probenverdünnung ( $OD_{rel}$ ) nach der folgenden Formel ermittelt:

$$OD_{rel} [\%] = \frac{(OD_{abs} - OD_{pos}) \times 100}{OD_{neg} - OD_{pos}}$$

Die so berechnete relative optische Dichte wurde dann gegen die jeweilige log-Verdünnungsstufe der Probe ( $\log_2$  oder  $\log_{10}$ ) aufgetragen (siehe **Abbildung 2**).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung zur Auswahl der Werte für die Berechnung der Stx2e-Konzentration einer Probe [ $CD_{50}/ml$ ] im Verozell-Zytotoxizitätstest (Beispiel)

Die Berechnung der zu 50 % verozytotoxischen Dosis pro Milliliter Probe ( $CD_{50}/ml$ ) erfolgte nach der Methode von Gentry und Dalrymple (1980). Dazu wurden die ermittelten  $OD_{abs}$ -Werte einer logit-log-Transformation unterzogen, um eine Linearisierung des mittleren Kurvenabschnitts zu erreichen. Diese Berechnung wurde mit Microsoft® Excel 2003 durchgeführt. Als Untergrenze (UG) wurde die OD der Positivkontrolle ( $OD_{pos}$ ) eingesetzt, sofern alle  $OD_{rel}$ -Werte der Proben  $\geq 0$  % lagen. Gab es  $OD_{rel}$ -Werte  $< 0$  %, so wurde der kleinste  $OD_{abs}$ -Wert minus 0,001 als Untergrenze verwendet. Als Obergrenze (OG) wurde die OD der Negativkontrolle ( $OD_{neg}$ ) eingesetzt, sofern alle  $OD_{rel}$ -Werte der Proben  $\leq 100$  % wa-

ren, sonst wurde der größte  $OD_{abs}$ -Wert plus 0,001 als Obergrenze verwendet. Die Formel der logit-log-Transformation lautete:

$$\text{logit-log-}OD_{abs} = \log_{10} (OD_{abs} - UG)/(OG - OD_{abs})$$

Danach wurde derjenige Kurvenabschnitt ermittelt, bei dem die relative optische Dichte ca. 50 % betrug. Je zwei Messwerte unterhalb sowie oberhalb dieses Abschnitts wurden zur Berechnung der Stx2e-Konzentration in  $CD_{50}/ml$  benutzt. Weniger Messwerte wurden nur dann berücksichtigt, wenn der Kurvenverlauf vor Ende des oberen Plateaus abfiel oder aber vor Ende des unteren Plateaus anstieg. Die Steigung  $m$  und der y-Achsenabschnitt  $b$  für diesen Kurvenabschnitt wurden dann mit Microsoft® Excel 2003 berechnet. Dazu wurden folgende Formeln eingesetzt:

$$\text{Steigung } m = \text{INDEX(RGP(A:B;C:D);1)}$$

$$\text{y-Achsenabschnitt } b = \text{INDEX(RGP(A:B;C:D);2)}$$

A ist der kleinste gültige logit-log-transformierte  $OD_{abs}$ -Wert, B der größte. C ist die Verdünnungsstufe des kleinsten gültigen logit-log-transformierten  $OD_{abs}$ -Werts, D die Verdünnungsstufe des größten. Die Stx2e-Menge [ $CD_{50}$ ] je Kavität konnte mit  $m$  und  $b$  berechnet werden:

$$\text{Stx2e-Menge } [CD_{50}/\text{Kavität}] = x^{b/m}$$

Dabei stellt  $x$  die Basis der gewählten logarithmischen Verdünnung dar (entsprechend  $10^{b/m}$  bei einer  $\log_{10}$ -Verdünnung bzw.  $2^{b/m}$  bei einer  $\log_2$ -Verdünnung). Durch Multiplikation der hierbei zunächst errechneten Stx2e-Menge je Kavität mit dem Faktor 20 erhielt man die Stx2e-Konzentration der Probe in  $CD_{50}/ml$ . Die Nachweisgrenze für biologisch aktives Stx2e lag damit bei 20  $CD_{50}/ml$ .

### 3.13 Nachweis von induzierbaren, lytischen Bakteriophagen

Zum Nachweis von lytischen Bakteriophagen wurde ein Protokoll von Prof. H. Schmidt und Dr. K. Creuzburg der Universität Hohenheim verwendet (Creuzburg 2008), welches nach einem am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere bereits etablierten Protokoll zur Isolierung von Stx1- und Stx2-kodierenden Bakteriophagen zwecks Isolierung von Stx2e-kodierenden Bakteriophagen modifiziert wurde.

#### 3.13.1 Induktion von Bakteriophagen

Ein Aliquot einer Standard-Schüttelkultur des zu untersuchenden *E. coli*-Stammes wurde im Verhältnis 1:100 (v/v) in frisches LB-Medium überimpft. Dem Gemisch wurden dann 5 mM  $MgSO_4$ -Lösung zugesetzt (f. c. 1,23 mg/ml). Danach wurde die Kultur inkubiert (aerob, 180 rpm, 37 °C), bis ihre  $OD_{600}$  zwischen 0,6 und 0,8 lag. Kulturen von Stämmen, deren Bakteriophagen mit UV-Licht induziert werden sollten, wurden nur bis zu einer  $OD_{600}$

zwischen 0,3 und 0,4 inkubiert. Nach erneuter Zugabe der 5 mM  $\text{MgSO}_4$ -Lösung (f. c. 2,46 mg/ml) wurde die Kultur in drei Ansätze geteilt. Einem Ansatz wurde Norfloxacin (f. c. 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt. Ein zweiter Ansatz wurde mit demjenigen exogenen Faktor (UV-Licht, Mitomycin C oder Antiinfektivum) behandelt, unter dessen Einfluss der untersuchte Stamm im Vergleich zu anderen exogenen Faktoren die bisher höchste Stx2e-Konzentration erzielt hatte (siehe **Kapitel 3.8**). Das betreffende Antiinfektivum wurde dazu in derjenigen Dosis zugesetzt, die seiner 100 %-igen MHK gegenüber dem fraglichen Stamm entsprach. Ein Ansatz blieb unbehandelt. Nach der Inkubation (aerob, 180 rpm, 37 °C, 4 h) aller drei Ansätze wurden die  $\text{OD}_{600}$  gemessen und anschließend Bakterienkulturüberstände gewonnen, die später im Plaquetest auf Plaque-erzeugende Aktivität gegenüber dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  untersucht wurden. Dazu wurden von jedem Ansatz 3 ml entnommen und durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415C, 13.000 rpm, 5 min) die Überstände von den Bakterienzellen getrennt. Zur Beseitigung restlicher Bakterien wurden die Überstände anschließend mit je einem Spritzenfilter (Filtereinheit Whatman® Rotrand, Fa. Schleicher und Schuell GmbH, 0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße) filtriert. Der letzte Tropfen des Filtrats wurde auf eine Blutagar-Platte ausgestrichen (Bebrütung aerob, 37 °C, 14 - 18 h), um es auf Freiheit von vermehrungsfähigen Bakterien zu kontrollieren. Die filtrierten und negativ auf vermehrungsfähige Bakterien getesteten Überstände wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von 48 h für weitere Untersuchungen verwendet.

**Tabelle 9: Behandlung von STEC-2e-Feldstämmen zur Induktion lytischer Bakteriophagen**

Behandlung mit:	Bezeichnung der in dieser Weise behandelten STEC-2e-Stämme
<b>Amoxicillin</b>	2947/02-2, 3379/02, P8106/01-3, 42/02, P106/01-3, P4470/03-1, 1735/03-1
<b>Colistin</b>	P8172/00-3
<b>Enrofloxacin</b>	4949/00, 2316/04-2, P8615/00-1, P4663/02, 1485/03 <sup>1)</sup> , 1694/03-1, 3465/04-2
<b>Mitomycin C</b>	299, P868/02, P5194/03-2, E57
<b>Neomycin</b>	P283/01, P2164/01-2, P3450/02-1, P3753/01-2, P1921/02-3, 1912/04, P5546/05-1
<b>Tetrazyklin</b>	82/02, P9116/00-7
<b>UV-Licht</b>	P5196/03-2, P5413/04-1

**Erläuterungen:** Die eingesetzte Dosis der Antiinfektiva war stammspezifisch und entsprach jeweils 100 % der MHK (f. c.) außer bei <sup>1)</sup>. Hier wurde Enrofloxacin mit 1  $\mu\text{g/ml}$  (f. c.) eingesetzt und nach 30 min aus der Kultur entfernt. Mitomycin C wurde mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (f. c.) eingesetzt. Die Bestrahlung mit UV-Licht erfolgte für 30 s bei 312 nm.

### 3.13.2 Plaquetest

Der Empfängerstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde als Standard-Schüttelkultur angezüchtet (aerob, 180 rpm, 37 °C, 14 - 18 h). Danach wurde er für den Plaquetest 1:100 (v/v) in frisches LB-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen weiter bebrütet, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 erreicht war. Währenddessen wurde LB-Weichagar (= *Top-Agar*) aufgeköcht und zu jeweils 4 ml in Röhrchen abgefüllt. Diese wurden dann im Wasserbad auf eine Temperatur von 47 °C gebracht. Nachdem der Empfängerstamm die erforderliche Kulturdichte aufwies, wurden je 100, 400 und 800  $\mu$ l der beiden pro Stamm durch Behandlung mit Norfloxacin sowie einem Antiinfektivum, Mitomycin C oder UV-Licht gewonnenen filtrierten Überstände (siehe **Kapitel 3.13.1** bzw. **Tabelle 9**) mit 100  $\mu$ l der Empfängerstammkultur vermischt. Zu dem Gemisch wurden 20  $\mu$ l 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugegeben. Nach Durchmischen mittels Vortex-Gerät erfolgte eine Inkubation der Mixtur im Wasserbad (37 °C, 20 min), um das Anheften von Phagenpartikeln an die Bakterienzellen des Empfängerstammes zu ermöglichen. Anschließend wurde diese Phagen-Bakterien-Suspension vollständig mit 4 ml *Top-Agar* gemischt (Vortex-Gerät) und dann als gleichmäßige Deckschicht auf LB-Agar (= *Bottom-Agar*) ausgebracht. Der *Top-Agar* wurde unter Vermeidung von Luftblasen durch Kreisen des *Bottom-Agars* auf einer ebenen Unterlage verteilt. Nach Lufttrocknung für 15 min wurden die Platten umgedreht und bei 37 °C aerob für ca. 20 h bebrütet. In jedem Plaquetest wurden als Negativkontrolle 100  $\mu$ l der Empfängerstammkultur und 20  $\mu$ l 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 4 ml *Top-Agar* ausplattiert, wobei keinerlei filtrierter Bakterienkulturüberstand zugegeben worden war. Damit sollten spontane lytische Effekte ausgeschlossen werden. Als Positivkontrolle diente der mit Norfloxacin (f. c. 0,5  $\mu$ g/ml) behandelte *E. coli*-Stamm „2771/97“ (siehe **Tabelle 5**).

Am Tag nach dem Ausplattieren erfolgte die visuelle Auswertung des Plaquetests. Dabei wurden die Platten auf „Löcher“ (Plaques) im Bakterienzellrasen abgesucht. War dies der Fall, wurde die Morphologie der Plaques hinsichtlich Begrenzung und Trübung dokumentiert. Die Plaques wurden außerdem gezählt, um die Anzahl Plaque-bildender Einheiten pro Milliliter (PbE/ml) filtriertem Bakterienkulturüberstand berechnen zu können. Einzelne Plaques wurde mit sterilen Pasteurpipetten ausgestochen und in je 500  $\mu$ l SM-Puffer überführt. Diese Suspensionen blieben für mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen, damit vorhandene DNS aus dem Agar diffundieren konnte. Anschließend konnten diese Suspensionen mittels Multiplex-PCR auf das Vorkommen *stx*<sub>2</sub>-spezifischer DNS untersucht werden.

### 3.13.3 *stx*<sub>2e</sub>-Phagentest

Von jedem Stamm wurden je 100  $\mu$ l des filtrierten Bakterienkulturüberstandes mit 100  $\mu$ l der Empfängerstammkultur sowie 20  $\mu$ l 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung vermischt. Nach Inkubation im

Wasserbad (37 °C, 20 min) wurden 100 µl der Mixtur in 3 ml LB-Medium gegeben (Bouillon-Kultur). Dieser Ansatz wurde bebrütet (aerob, 180 rpm, 37 °C, 14 - 18 h). Ein Aliquot dieses Ansatzes wurde danach mittels Multiplex-PCR auf das Vorkommen *stx*<sub>2</sub>-spezifischer DNS untersucht.

### 3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Untersuchung von *E. coli*-Stämmen, Kulturüberständen und Plaques kamen verschiedene PCR-Tests zum Einsatz. Einheitlich wurden zur Prüfung von genomischer DNS 3 - 4 Kolonien je Stamm in 2 ml LB-Medium überimpft und bebrütet (aerob, 180 rpm, 37 °C, 14 - 18 h). Die als Primer verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg bezogen. Sie wurden mit *A. demin.* auf eine Konzentration von jeweils 100 µM (Stammlösung) bzw. 20 µM (Gebrauchslösung) eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die PCRs wurden mit den entsprechenden Parametern im Thermocycler T1 oder TGradient 96 durchgeführt.

#### 3.14.1 Multiplex-PCR

Zur Prüfung von *E. coli*-Stämmen auf das Vorkommen von Genen für verschiedene Adhäsionsfaktoren, Enterotoxine sowie für Stx wurde die Multiplex-PCR nach Casey und Bosworth (2009) benutzt. Aus dem LB-Agar ausgestochene Plaques sowie filtrierte Kulturüberstände wurden zwecks Prüfung auf Stx2-kodierende Bakteriophagen ebenfalls mit dieser PCR auf *stx*<sub>2</sub>-Sequenzen untersucht. Jeder Reaktionsansatz enthielt 1 x NH<sub>4</sub>-Mix, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM je Oligodesoxyribonukleotid (Primer), 133 µM je Nukleotid sowie 0,03 U/µl PANScripT DNA-Polymerase. Zu diesem Ansatz wurden 3 µl der zu prüfenden Suspension bzw. Lösung pipettiert. Die verwendeten Primer sind in der **Tabelle 10** aufgeführt. Als Positivkontrollen dienten die *E. coli*-Stämme Abbotstown, B41, E57 und TTP-1 (siehe **Tabelle 5**), als Negativkontrolle wurde LB-Medium anstelle der Bakteriensuspension eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Muster: Initiale Denaturierung für 5 min bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit je 30 s Denaturierung (94 °C), 30 s Annealing (55 °C) und 1 min Extension (72 °C). Den Abschluss bildete eine finale Extension für 5 min bei 72 °C. Die Auswertung erfolgte mittels Elektrophorese in 3 %-igen Agarosegelen.

#### 3.14.2 *stx*<sub>2</sub>-Typisierungs-PCRs

Um den Stx2-Subtyp der STEC-Stämme zu bestimmen, wurden pro Stamm fünf verschiedene Monoplex-PCRs (Nachweis von *stx*<sub>2a</sub>, *stx*<sub>2b</sub> [ehem. *stx*<sub>2d</sub>], *stx*<sub>2c/2d</sub> [ehem. *stx*<sub>2c</sub>], *stx*<sub>2e</sub>, *stx*<sub>2f</sub>) nach Nakao *et al.* (2002) durchgeführt, da das Primerpaar der Multiplex-PCR (Casey und Bosworth 2009) nicht für den Subtyp *stx*<sub>2e</sub> spezifisch ist. Laut Barth *et al.* (2003)

detektiert die Multiplex-PCR die *stx*-Subtypen *stx*<sub>2a</sub>, *stx*<sub>2b</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub> und *stx*<sub>2e</sub>. Der Subtyp *stx*<sub>2f</sub> wird dagegen nicht erkannt. Ein Reaktionsansatz der Monoplex-PCR entsprach in seiner Zusammensetzung prinzipiell dem der Multiplex-PCR. Die Primer sind in der **Tabelle 11** angegeben. Als Positivkontrollen dienten die *E. coli*-Stämme EDL 933 (*stx*<sub>2a</sub>), E32511 (*stx*<sub>2c</sub>), EH250 (*stx*<sub>2b</sub>, ehemals gemäß Calderwood *et. al.* *stx*<sub>2d</sub>), 412 (*stx*<sub>2e</sub>) und BgVV97/00 (*stx*<sub>2f</sub>), siehe **Tabelle 5**. Als Negativkontrolle wurde LB-Medium anstelle der Bakteriensuspension eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Muster: Initiale Denaturierung für 5 min bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit je 30 s Denaturierung (94 °C), 30 s Annealing und 1 min Extension (72 °C). Die Annealingtemperatur betrug 55 °C für *stx*<sub>2e</sub>, 61 °C für *stx*<sub>2f</sub>, 65 °C für *stx*<sub>2a</sub> bzw. *stx*<sub>2b</sub>, und 69 °C für *stx*<sub>2c/2d</sub>. Den Abschluss bildete eine finale Extension für 5 min bei 72 °C. Die Analyse der Amplifikate erfolgte visuell nach elektrophoretischer Auftrennung in 1,5 %-igen Agarosegelen.

### 3.14.3 Agarosegelelektrophorese und Bilddokumentation

Die Auftrennung von PCR-Amplifikaten erfolgte in horizontalen Flachbettgelen mit 1,5 bis 3 % Agarose. Als Laufpuffer wurde Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (1 x TAE) verwendet. Es wurde eine Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand für 0,5 bis 2,5 h angelegt. Die Gele wurden vor dem Gießen mit 0,1 µg/ml (*f. c.*) Ethidiumbromid versetzt. Der Probenauftrag erfolgte nach Mischen des PCR-Ansatzes im Verhältnis von 1:6 (*v/v*) mit 6 x Ladepuffer. Zur Bestimmung der molekularen Masse der Amplifikate wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fa. Fermentas GmbH) mitgeführt. Die Visualisierung erfolgte mit UV-Licht (UV-Bildanalyse-Tisch, UVT-20 M/W, Fa. Herolab GmbH). Zur Dokumentation von PCR-Ergebnissen wurden die Elektropherogramme abgebildet und diese Abbildungen bildtechnisch weiterverarbeitet. Die Aufnahmen wurden mit dem Bilddokumentationssystem des Instituts (Modell E.A.S.Y. 429K, Fa. Herolab GmbH) gemacht.

**Tabelle 10: Primer der Multiplex-PCR nach Casey und Bosworth (2009)**

Name	Sequenz (5' → 3')	Gen	Amplikon (bp)	Position <sup>1)</sup>	GenBank-Nr.
STb-1	TGCCTATGCATCTACACAAT	<i>estb</i>	113	<u>225 - 244</u> <u>318 - 337</u>	M35729
STb-2	CTCCAGCAGTACCATCTCTA				
STaP-1	CAACTGAATCACTTGACTCTT	<i>estap</i>	158	<u>347 - 367</u> <u>485 - 504</u>	V00612
STaP-2	TTAATAACATCCAGCACAGG				
K99-1	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA	<i>fanA</i>	230	<u>488 - 507</u> <u>698 - 717</u>	X05797
K99-2	AACCTTTGTGGTTAACTTCCT				
LT-1	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	<i>elt</i>	272	<u>33 - 52</u> <u>286-304</u>	M15363
LT-2	TGGTCTCGGTCAGATATGT				
F18-1	TGGTAACGTATCAGCAACTA	<i>fedA</i>	313	<u>246 - 265</u> <u>539 - 558</u>	M61713
F18-2	ACTTACAGTGCATTTCGACG				
P987-1	AAGTTACTGCCAGTCTATGC	<i>fasA</i>	410	<u>705 - 724</u> <u>1094 - 1114</u>	U50547
P987-2	GTAATCCACCCTTTGTATC				
F-EaeA-1	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	<i>eae</i>	425	<u>1060 - 1081</u> <u>1463 - 1484</u>	Z11541
F-EaeA-2	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA				
K88-1	GTTGGTACAGGTCTTAATGG	<i>faeG</i>	499	<u>183 - 202</u> <u>662 - 681</u>	M29375
K88-2	GAATCTGTCCGAGAATATCA				
F41-1	AGTATCTGGTTCAGTGATGG	<i>fim41A</i>	612	<u>299 - 318</u> <u>891 - 910</u>	X14354
F41-2	CCACTATAAGAGGTTGAAGC				
Stx2e-1	AATAGTATACGGACAGCGAT	<i>stx<sub>2</sub></i>	733	<u>359 - 378</u> <u>1072 - 1091</u>	M21534
Stx2e-2	TCTGACATTCTGGTTGACTC				

**Erläuterung:** <sup>1)</sup> Die Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der Datenbank GenBank. Die Positionen der Gegenstrangprimer sind unterstrichen.

**Tabelle 11: Primer der *stx<sub>2</sub>*-Typisierungs-PCRs nach Nakao *et al.* (2002)**

Name	Sequenz (5' → 3')	Gen	Amplikon (bp)	Position <sup>1)</sup>	GenBank-Nr.
stx2-F	AGATATCGACCCCTCTTGAA	<i>stxA<sub>2</sub></i>	967	<u>372 - 391</u> <u>1319 - 1338</u>	X07865
stx2-R	GTCAACCTTCACTGTAATG	<i>stxB<sub>2</sub></i>			
stx2-G1-F	TACGATGACGCCGGGAGAC	<i>stxA<sub>2c</sub></i>	468	<u>829 - 847</u> <u>1275 - 1296</u>	M59432
stx2-G1-R	GGCCACTTTTACTGTGAATGTA	<i>stxB<sub>2c</sub></i>			
stx2-G2-F	TATACGATGACACCGGAAGAAG	<i>stxA<sub>2d</sub></i>	300	<u>807 - 828</u> <u>1086 - 1106</u>	AF043627
stx2-G2-R	CCTGCGATTCCAGAAAAGCAGC	<i>stxA<sub>2d</sub></i>			
stx2-G3-F	TTTACTGTGGATTTCTCTTCGC	<i>stxA<sub>2f</sub></i>	875	<u>326 - 347</u> <u>1180 - 1200</u>	M29153
stx2-G3-R	TCAGTAAGATCCTGAGGCTTG	<i>stxA<sub>2f</sub></i>			
stx2-G4-F	CAGGAAGTTATATTCCGTAGG	<i>stxA<sub>2e</sub></i>	911	<u>406 - 427</u> <u>1295 - 1316</u>	M36727
stx2-G4-R	GTATTCTCTTCCTGACACCTTC	<i>stxB<sub>2e</sub></i>			

**Erläuterung:** <sup>1)</sup> Die Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der Datenbank GenBank. Die Positionen der Gegenstrangprimer sind unterstrichen.

### 3.15 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Microsoft® Office-Programm Excel 2003 bzw. 2007. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm „BMDP“, Ausgabe 8.1, durch Herrn Dr. rer. nat. Klaus Failing (AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) vorgenommen. Zudem wurden statistische Analysen mit dem Programm „IBM SPSS Statistics“ (Version 22) durch Herrn Dipl.-Soz. Wolf Riepl (Social Science Research, Dresden) durchgeführt. Bei allen Berechnungen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ) festgesetzt. Die Signifikanzwerte (p-Werte) wurden wie folgt in den Abbildungen gekennzeichnet:

schwach signifikant ( $0,01 < p \leq 0,05$ ) mit \* ,

signifikant ( $0,001 < p \leq 0,01$ ) mit \*\* ,

hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) mit \*\*\*.

Nicht signifikante Unterschiede wurden nicht extra gekennzeichnet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Merkmale der 30 ausgewählten STEC-2e-Stämme von Schweinen

Mittels PCR wurden *E. coli*-Stämme, die aus dem Probenmaterial von Schweinen isoliert worden waren, auf das Vorkommen der Gene folgender Virulenzfaktoren untersucht: Stx2 und seine Subtypen inkl. Stx2e, Fimbrien F4, F5, F6, F18 und F41, *E. coli*-Enterotoxine ST-Ip, ST-II, LT-I sowie Intimin. Das Vorkommen der O-Antigene 8, 138, 139, 141, 147, 149 und 157 wurde ebenfalls geprüft. Die Ergebnisse für die 30 Stämme, bei denen die Auswirkung exogener Faktoren auf die Stx2e-Bildung im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde, sind in der **Tabelle 12** dargestellt.

**Tabelle 12:** Virulenzgene und O-Typen ausgewählter STEC-2e-Stämme von Schweinen

Stamm-bezeichnung	Pathovar	nachgewiesene Virulenzgene	nach-gewie-sener O-Typ	Erkrankung des betroffenen Schweins
299	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O139	k. A.
4946/00	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O138	VE
P868/02	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O139	DI, VE
82/02	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O141	DI
2947/02-2	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O139	DI
3379/02	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O141	ED
P5194/03-2	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O138	ED
P5196/03-2	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O138	ED
P5413/04-1	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>faeG</i>	O141	DI
2316/04-2	EDEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i>	O139	k. A.
E57	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i>	O138	k. A.
P8615/00-1	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O141	DI
P283/01	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O147	DI
P2164/01-3	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O147	DI
P8106/01-3	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i>	O138	DI
P3450/02-1	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O147	ED
P4663/02	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	n.t.	DI
42/02	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O141	DI, ED
P106/03-1	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O141	DI
P4470/03-1	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O141	DI
1485/03	EDEC/ETEC	<i>stx<sub>2e</sub></i> , <i>fedA</i> , <i>estb</i> , <i>elt</i>	O141	DI

Fortsetzung der **Tabelle 12** auf der nächsten Seite

Stamm- bezeich- nung	Pathovar	nachgewiesene Virulenzgene	nach- gewie- sener O-Typ	Erkrankung des betroffenen Schweins
<b>P8172/00-3</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	n.t.	DI
<b>P9116/00-7</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	n.t.	DI
<b>P3753/01-4</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	n.t.	DI
<b>P1921/02-3</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	n.t.	DI
<b>1694/03-1</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	n.t.	VE
<b>1735/03-1</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	O139	DI
<b>1912/04</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	O147	andere
<b>3465/04-2</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	O141	andere
<b>P5546/05-1</b>	Sonst. STEC-2e	<i>stx<sub>2e</sub></i>	O141	k. A.

**Erläuterungen:** **DI** Diarrhö; **ED** *Edema Disease*, Ödemkrankheit der Schweine; **EDEC** *Edema Disease E. coli*; **ETEC** Enterotoxische *E. coli*; **k. A.** keine Angaben; **n. t.** nicht typisierbar; **n. u.** nicht untersucht; **sonst. STEC-2e** Stämme mit *stx<sub>2e</sub>*-Gen, aber ohne Gene für F4-, F5-, F6-, F18-, F41-Fimbrien oder *E. coli*-Enterotoxine; **VE** Verenden

## 4.2 Etablierung und Validierung des Stx2e-ELISA

Zum Shigatoxin-Nachweis wurde ein eigener Antigen-ELISA etabliert, bei dem zwei monoklonale Antikörper mit Spezifität für Stx2-Subtypen (Fa. Sifin Diagnostics GmbH, Berlin) als Fangantikörper bzw. Detektionsantikörper eingesetzt wurden.

### Ermittlung der Fangantikörper-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Menge des Fangantikörpers VT 136/8-H4 wurde die rekombinante Stx2e-Charge rStx2e/03/05 als Antigen verwendet (**Abbildung 3**). Als Negativkontrolle diente der Ultraschall-Lysatüberstand des *stx*-negativen *E. coli*-Stammes C600. Die Höhe der OD-Messwerte war dabei sowohl von der Menge an eingesetztem Antigen als auch von der Menge an Fangantikörper abhängig. Die vom Hersteller empfohlene Konzentration von 1 µg/Kavität resultierte nicht in wesentlich höheren Messwerten als die Konzentration von 0,8 µg/Kavität. Daher wurde der Fangantikörper in einer Konzentration von 0,8 µg/Kavität eingesetzt.

### Beschichtungsdauer der Mikrotiterplatte

Es wurde geprüft, wie sich die Dauer der Plattenbeschichtung mit dem Fangantikörper sowie die Temperatur während dieser Inkubation auf den Stx2e-Nachweis auswirkten (**Abbildung**

4). Dazu wurden zwei Mikrotiterplatten mit 0,8 µg/Kavität des Fangantikörpers belegt. Die eine Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei 37 °C bebrütet, die andere Platte für 14 h bei Raumtemperatur. Als Antigene wurden die rekombinante Stx2e-Charge rStx2e/03/05 sowie die Kulturüberstände und Ultraschall-Lysatüberstände der beiden STEC-2e-Feldstämme P8413/00 und P9160/00-3 mitgeführt. Das Antigen rStx2e/03/05 wurde in einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe eingesetzt. Die Überstände der beiden Feldstämme wurden unverdünnt verwendet. Die OD-Messwerte der rStx2e/03/05-Verdünnungen waren bei der Inkubationsdauer von 14 h um 45 bis 122 % größer als nach nur einstündiger Beschichtungsdauer. In Analogie dazu waren die OD-Messwerte der Feldstamm-Überstände um 7 bis 56 % größer. In der finalen Arbeitsvorschrift wurde deshalb eine Beschichtungsdauer von 14 - 16 h bei Raumtemperatur festgelegt.

### Kompetitiver Epitop-ELISA

In einer eigenen Versuchsreihe wurde geprüft, ob der Fangantikörper VT 136/8-H4 und der Detektionsantikörper VT 135/6-B9 an gleiche oder benachbarte Epitope des Stx2e-Moleküls binden und sich dadurch womöglich gegenseitig behindern, was die Sensitivität des ELISA herabsetzen würde. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens rStx2e/03/05 (Gesamtproteingehalt 0,4 µg, 2 µg bzw. 4 µg pro Kavität) sowie alternativ mit aufgereinigtem Stx2 (0,001 µg/Kavität, Fa. Sigma-Aldrich) beschichtet. Der Fangantikörper VT 136/8-H4 wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (0,1 bis 1,4 µg/Kavität), während die verwendete Menge des Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörpers 135/6-B9 pro Kavität stets gleich blieb (0,1113 µg/Kavität). Wie die Versuchsauswertung ergab, war die Höhe der OD-Werte nur abhängig von der Antigenmenge, nicht jedoch von der Menge an Fangantikörper (**Abbildung 5**). Daraus kann geschlossen werden, dass die beiden Antikörper nicht um das gleiche oder eng benachbarte Epitope konkurrierten.

### Linearer Messbereich

Der lineare Messbereich des Stx2e-ELISA wurde bestimmt, indem drei voneinander unabhängige log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihen von rStx2e/03/05 hergestellt und im Stx2e-ELISA getestet wurden (**Abbildung 6**). Im Ergebnis waren die ermittelten OD-Werte zur eingesetzten Antigenmenge annähernd proportional, wenn sie zwischen 0,5 und 2,0 lagen.

### Spezifität des Stx2e-ELISA

Die monoklonalen Antikörper VT 136/8-H4 und VT 135/6-B9 erkennen laut Hersteller den Stx-Typ „Stx2“. Mit 27 *E. coli*-Kontrollstämmen, die verschiedene Stx-Typen bzw. -Subtypen kodierten, sollte die Spezifität der Antikörper überprüft und insbesondere festgestellt werden,

ob sie in der Lage sind, auch den Subtyp „Stx2e“ zu erkennen (**Tabelle 13**). Dazu wurden von diesen Stämmen Ultraschall-Lysat- und Kulturüberstände hergestellt und im Stx2e-ELISA getestet. Dabei reagierten diejenigen Stämme, die für Stx2a, Stx2c, Stx2d und Stx2e kodierten, positiv, da bei ihnen mindestens eine der beiden getesteten Fraktionen ein positives Signal ergab. Alle anderen überprüften Stämme reagierten negativ. Bei Stämmen, die für mehr als einen Subtyp kodierten und im Stx2e-ELISA ein positives Resultat lieferten, konnte keine eindeutige Zuordnung der positiven Reaktion zu einem Subtyp getroffen werden.

### Interassay-Varianz

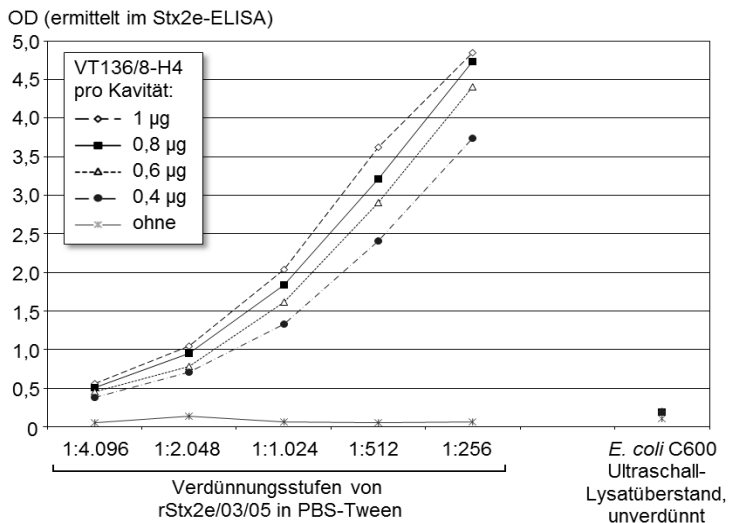
Um Schwankungen zwischen den Stx2e-ELISA-Ergebnissen unterschiedlicher Versuchstage einschätzen zu können, wurden  $\log_2$ -Verdünnungsreihen der Stx-Chargen rStx2e/03/05 und rStx2e/01/05 über 4 bzw. 3 Stufen hergestellt. Die an 20 verschiedenen Tagen auf jeweils einer Mikrotiterplatte für jede Verdünnungsstufe ermittelten OD-Werte waren die Grundlage zur Berechnung von arithmetischen Mittelwerten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (**Abbildung 7**). Die Variationskoeffizienten lagen dabei zwischen 9,9 % und 21 % (arithmetischer Mittelwert 15,1 %).

### Intraassay-Varianz

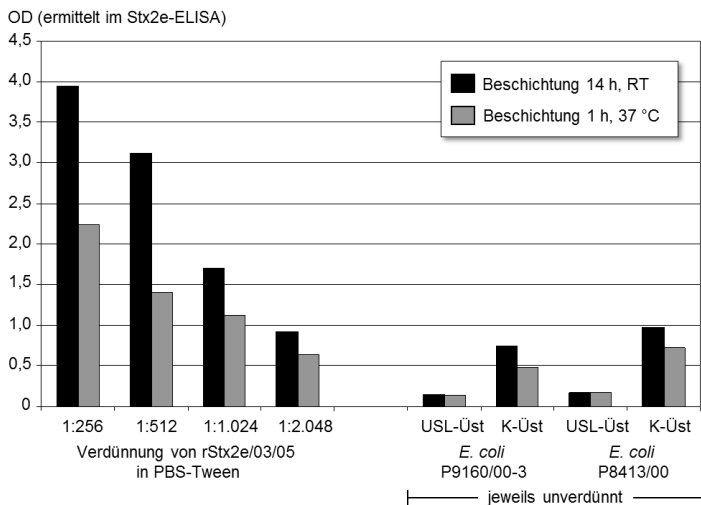
Um festzustellen, wie stark die Stx2e-ELISA-Ergebnisse einer Probe schwankten, wurden  $\log_2$ -Verdünnungsreihen der Stx-Charge rStx2e/03/05 herangezogen. Die Ausgangsverdünnung und die Verdünnungsreihe wurden dreimal hergestellt und dann jeweils im Dreifachansatz an ein und demselben Tag auf einer einzigen Mikrotiterplatte getestet, so dass sich neun Messreihen ergaben. Pro Dreifachansatz und pro Verdünnungsstufe wurden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Die Ergebnisse der Dreifachansätze wurden für jede Verdünnungsstufe erneut arithmetisch gemittelt (siehe **Abbildung 8**). Aus den vier resultierenden Variationskoeffizienten, die, abhängig von der Verdünnungsstufe, Werte zwischen 1,2 bis 3,4 % annahmen, ergab sich im arithmetischen Mittel ein Variationskoeffizient (Intraassay-Varianz) von 2,4 %.

### Bestimmung von Cut-Off-Werten

Zur Beurteilung einer Probe als positiv bzw. negativ dienten Cut-Off-Werte, die aus den Messwerten von zehn *stx*<sub>2e</sub>-negativen *E. coli*-Stämmen ermittelt worden waren (siehe **Tabelle 14** und **Tabelle 15**). Der Stx2e-Nachweis war positiv, wenn die im Stx2e-ELISA bestimmte Stx2e-Konzentration von Kulturüberständen 44,70 OD % überschritt. Analog galt für die Lysatüberstände das Überschreiten von 25,23 OD % als positiver Stx2e-Nachweis.



**Abbildung 3:** Reaktion zweier *E. coli*-Lysate (mit/ohne Stx2e) im Stx2e-ELISA bei Variation der Fangantikörper-Konzentration (mAk VT 136/8-H4)

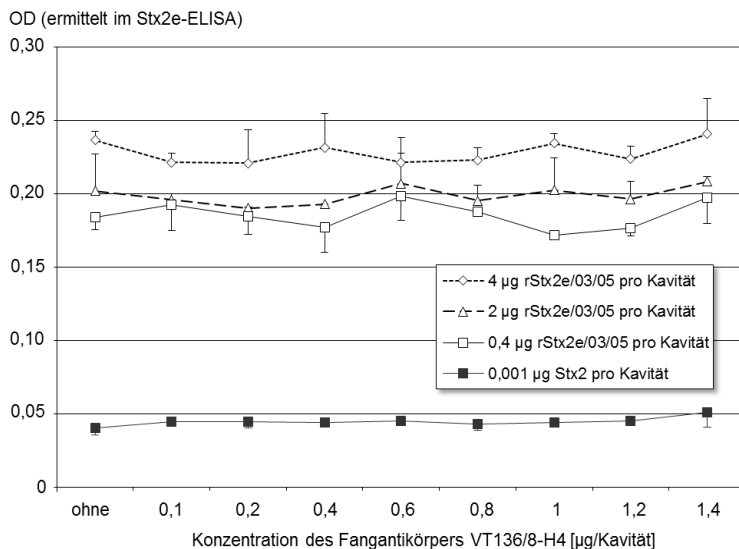


**Abbildung 4:** Reaktion von Stx2e-haltigem Kulturmaterial im Stx2e-ELISA bei Variation der Inkubationsbedingungen zur Plattenbeschichtung mit dem Fangantikörper VT 136/8-H4

RT Raumtemperatur

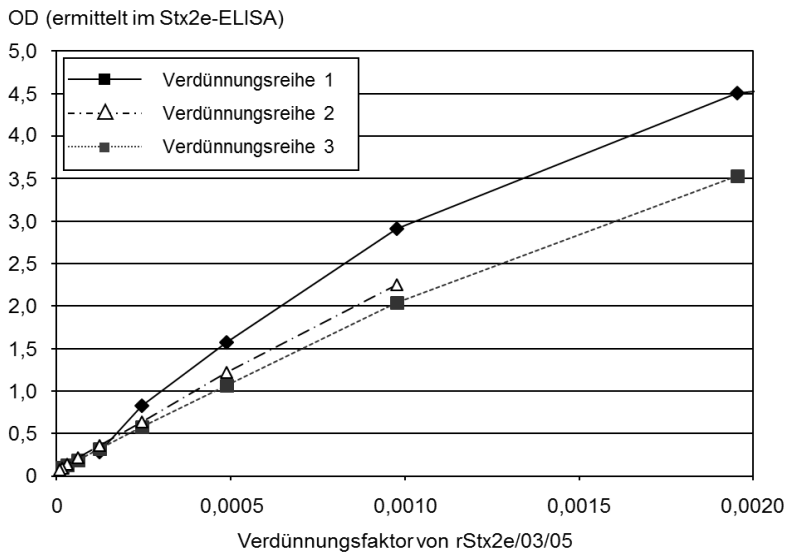
USL-Üst Ultraschall-Lysatüberstand

K-Üst Kulturüberstand



**Abbildung 5: Kompetitiver Epitop-ELISA mit dem Fangantikörper VT 136/8-H4 und dem Detektionsantikörper VT 135/6-B9.**

Verwendete Antigene: rStx2e/03/05 bzw. aufgereinigtes Stx2 (Fa. Sigma-Aldrich)



**Abbildung 6: Bestimmung des linearen Messbereichs des Stx2e-ELISA mit drei unabhängigen Verdünnungsreihen des Antigens rStx2e/03/05**

**Tabelle 13: Ergebnisse der Spezifitätsprüfung des Stx2e-ELISA**

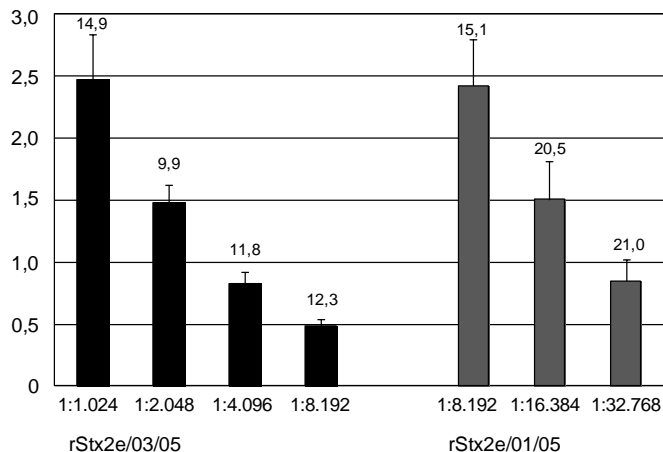
Stamm	IHIT-Nr.	kodierter Stx- (Sub-) Typ	Stx2e-ELISA-Ergebnis			
			USL-Üst		Kultur-Üst	
			[OD %]	Be- fund	[OD %]	Be- fund
031	x-0509/02	Stx2b, Stx2c	221,29	+	175,92	+
412	x-0505/02	Stx2e	60,70	+	11,69	+
520	x-0510/02	Stx2b <sup>†</sup>	11,97	-	9,98	-
521	x-0511/02	Stx2c <sup>†</sup>	424,26	+	49,01	+
2403	x-0269/99	Stx1 <sup>††</sup>	14,07	-	13,33	-
2771/97	x-0657/05	Stx2e	223,08	+	412,70	+
4756/98	x-0502/02	Stx1c <sup>†</sup> , Stx2b <sup>†</sup>	17,63	-	9,98	-
5720/96	x-0672/05	Stx2a <sup>†</sup>	79,86	+	13,30	-
B2F1	x-0495/02	Stx2d	477,91	+	447,82	+
BgVV 97/00	x-0542/02	Stx2f	13,96	-	11,24	-
E57	x-0279/99	Stx2e	12,17	-	16,94	-
E32511	x-0507/02	Stx2c	201,80	+	22,14	-
E32511/0	x-0286/99	Stx2a, Stx2c	503,35	+	488,32	+
E32511/HSC	x-0673/05	Stx2c	471,10	+	285,69	+
EDL 933	x-0274/99	Stx1a, Stx2a	178,96	+	528,31	+
EH250	x-0674/05	Stx2b	10,68	-	9,90	-
EH250	x-0506/02	Stx2b	9,58	-	16,41	-
F107/86	x-0285/99	Stx2e	442,94	+	54,15	+
Fac9/1	x-0498/02	Stx2e	24,30	-	19,66	-
Fac9/2	x-0501/02	Stx2e	31,90	+	18,60	-
GÖ15III	x-0284/99	Stx2e	20,23	-	52,45	+
H.I.8	x-0508/02	Stx2f	9,94	-	10,82	-
NV206/1	x-0500/02	Stx2d	324,49	+	432,47	+
NV206/2	x-0496/02	Stx2d	114,91	+	152,61	+
OX3:H11	x-0497/02	Stx2b <sup>†</sup> , Stx2c <sup>†</sup>	325,41	+	192,89	+
PH	x-0512/02	Stx1a, Stx2a, Stx2b <sup>†</sup>	130,18	+	122,82	+
TTP-1	x-0276/99	Stx1a <sup>†</sup> , Stx2a <sup>†</sup>	407,53	+	506,19	+

**Erläuterungen:** **Befund** Bewertung des Stx2e-ELISA-Ergebnisses auf Grundlage der Cut-Off-Werte als positiv (+) bzw. negativ (-), Cut-Off-Werte siehe **Tabelle 15**; **Fac9/1** Phänotyp mit Hämolyse; **Fac9/2** Phänotyp ohne Hämolyse; **Kultur-Üst** Kulturüberstand; **NV206/1** bildet dunkle Kolonien auf Schafblutagar; **NV206/2** bildet helle Kolonien auf Schafblutagar; **USL-Üst** Ultraschall-Lysatüberstand.

<sup>†</sup> Die Stx-Subtypisierung erfolgte im Nationalen Referenzlabor für Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (NRL VTEC) des Friedrich-Loeffler-Instituts, Jena.

<sup>††</sup> Die Bezeichnung folgt der Nomenklatur nach Calderwood *et al.* (1996), da zu diesem Stamm weder die Nukleotidsequenz des *stx*-Gens noch ein Subtypisierungsergebnis publiziert ist.

OD (ermittelt im Stx2e-ELISA)

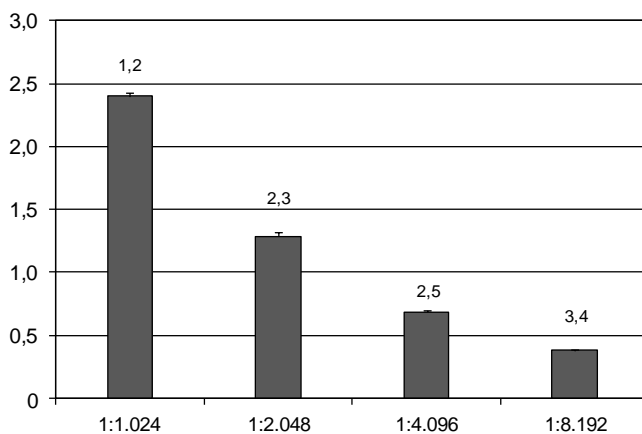


Verdünnungsstufen des jeweiligen Antigens

**Abbildung 7: Bestimmung der Interassay-Varianz im Stx2e-ELISA**

Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der an 20 verschiedenen Tagen ermittelten Messwerte. Die Zahlen über dem jeweiligen Balken entsprechen den Variationskoeffizienten [%].

OD (ermittelt im Stx2e-ELISA)



Verdünnungsstufen des Antigens rStx2e/03/05

**Abbildung 8: Bestimmung der Intraassay-Varianz im Stx2e-ELISA**

Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der an einem Tag in neun Messreihen ermittelten Messwerte. Die Zahlen über dem jeweiligen Balken entsprechen den Variationskoeffizienten [%].



**Tabelle 14: Messwerte von *stx*<sub>2e</sub>-negativen *E. coli*-Stämmen im Stx2e-ELISA**

<i>E. coli</i> -Stamm	Virulenzgene	Kulturüberstand		USL-Überstand	
		OD	Stx2e-Konz. [OD %]	OD	Stx2e-Konz. [OD %]
P1766/01-1	<i>fedA, estb, elt</i>	0,138	11,6	0,084	7,0
P6180/00	<i>fedA, estb, elt</i>	0,146	14,4	0,115	11,4
P2672/04-2	neg.	0,131	18,7	0,092	13,2
838/05	<i>fim41A</i>	0,094	15,6	0,094	7,7
P929/01-1	<i>faeG, estb, elt</i>	0,152	17,1	0,107	12,0
3848/03	<i>faeG, estb, elt</i>	0,110	18,2	0,086	7,0
P3261/04-1	<i>faeG, estb, elt</i>	0,161	16,0	0,078	7,8
P5670/04-3	<i>fanA, fim41A, estap</i>	0,101	8,3	0,091	7,5
P0695/01-2	<i>fanA, estap</i>	0,158	10,5	0,101	6,7
987P	<i>fasA, estap</i>	0,161	54,5	0,089	30,1
<b>MW</b>		0,135	<b>18,5</b>	0,094	<b>11,0</b>
<b>SD</b>		0,025	<b>13,1</b>	0,011	<b>7,1</b>

**Erläuterungen:** **MW** arithmetischer Mittelwert; **neg.** keine Virulenzgene mittels Multiplex-PCR nach Casey und Bosworth (2009) nachweisbar; **OD** OD<sub>450 - 620 nm</sub>;  
**SD** Standardabweichung; **Stx2e-Konz.** Stx2e-Konzentration einer Probe nach Normalisierung auf rStx2e/03/05; **USL-Überstand** Ultraschall-Lysatüberstand

**Tabelle 15: Cut-Off-Werte im Stx2e-ELISA**

Probenmaterial	Cut-Off	
	Definition	Wert [OD %]
<b>Kulturüberstand</b>	MW + 2 x SD	44,70
<b>Lysatüberstand</b>	MW + 2 x SD	25,23

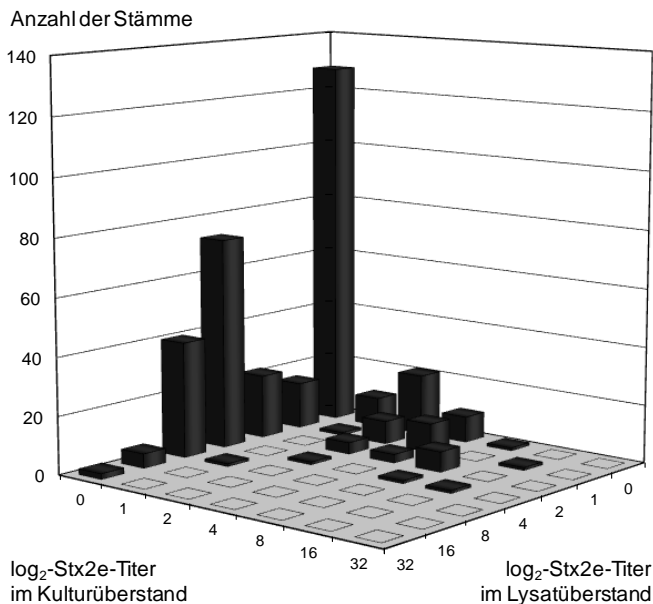
**Erläuterungen:** **Lysatüberstand** bezeichnet sowohl Ultraschall- als auch BugBuster®-Lysatüberstand; **MW** arithmetischer Mittelwert der Messwerte 10 *stx*<sub>2e</sub>-negativer *E. coli*-Stämme; **SD** Standardabweichung

### 4.3      **Stx2e-Bildung porciner STEC-2e-Feldstämme unter Standardanzuchtbedingungen**

Insgesamt wurden 365 STEC-2e-Feldstämme von Schweinen auf ihre Stx2e-Bildung untersucht. Alle Stämme wurden unter Standardbedingungen kultiviert und die Stx2e-Konzentration in BB-Lysatüberständen und Kulturüberständen bestimmt. Die Stx2e-Quantifizierung erfolgte sowohl mit dem Stx2e-ELISA als auch mit dem Verozell-Zytotoxizitätstest.

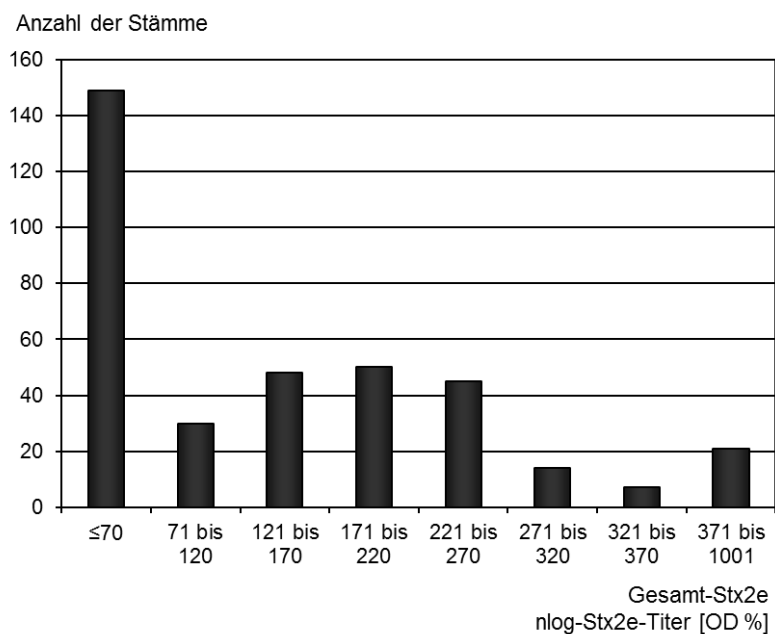
#### 4.3.1      **Stx2e-Nachweis mit dem Stx2e-ELISA**

Unter Standardbedingungen war bei 128 der 365 (35,1 %) STEC-2e-Feldstämme mit dem Stx2e-ELISA kein Stx2e nachweisbar. Bei 237 Stämmen (64,9 %) war Stx2e entweder ausschließlich im BB-Lysatüberstand (158 Stämme; 43,3 %) oder nur im Kulturüberstand (41 Stämme; 11,2 %) oder aber in beiden Fraktionen (38 Stämme; 10,4 %) detektierbar. Die ermittelten Stx2e-Konzentrationen lagen zwischen 3 und 980 OD % (nlog-Stx2e-Titer, Lysatüberstände) bzw. zwischen 3 und 750 OD % (nlog-Stx2e-Titer, Kulturüberstände). Bei den Stämmen mit nachweisbarem Stx2e (n = 237) kam dieses bei 199 Stämmen (84 %) in einer der beiden Zellfraktionen vor, also entweder im BB-Lysatüberstand des jeweiligen Stammes oder in dessen Kulturüberstand. Nur bei 38 der 237 Stx2e-positiven Stämme (16 %) war Stx2e in beiden Fraktionen gleichzeitig nachgewiesen worden (siehe **Abbildung 9**).



**Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung von 365 porcinen STEC-2e-Feldstämmen nach der Stx2e-Menge in ihren Kultur- und BB-Lysatüberständen.**  
(Ergebnisse des Stx2e-ELISA)

Der höchste  $\log_2$ -Stx2e-Titer, bezogen auf das Gesamt-Stx2e eines porcinen STEC-2e-Feldstammes, lag bei 1.001 OD %. Dabei wurde das Gesamt-Stx2e durch Summation aus dem  $\log_2$ -Stx2e-Titer von BB-Lysat- und Kulturüberstand jedes Stammes berechnet. Verglichen mit den zwei humanen STEC-Stämmen EDL 933 und 2771/97 bildeten die porcinen STEC-2e-Stämme nach Standardanzucht deutlich geringere Mengen an Shigatoxin. Die beiden humanen STEC-Stämme erzielten unter den gleichen Anzuchtbedingungen im Kulturüberstand im Mittel (arithmetische Mittelwerte aus acht Messungen, Daten nicht gezeigt)  $\log_2$ -Stx2e-Titer von 7.332 OD % (STEC-Stamm EDL 933) bzw. 1.498 OD % (STEC-Stamm 2771/97).



**Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung von 365 porcinen STEC-2e-Feldstämmen nach der gesamten Stx2e-Menge in der Kultur**  
(Ergebnisse des Stx2e-ELISA).

Die gesamte Stx2e-Menge in der Kultur eines Stammes wurde durch Addition der nlog-Stx2e-Titer seines Kultur- und seines BB-Lysatüberstandes berechnet.

Die Stx2e-Konzentration in Abhängigkeit von der Klassifikation der Stämme als EDEC, EDEC/ETEC oder sonstige STEC-2e (insgesamt 353 der 365 Stämme) ist in der **Abbildung 11** dargestellt. Hinsichtlich des Gesamt-Stx2e unterschieden sich die typischen Ödemkrankheitserreger (EDEC;  $stx_{2e}^+$ ,  $fedA^+$ ) nicht signifikant von sonstigen STEC-2e-Stämmen, die definitionsgemäß ausschließlich das  $stx_{2e}$ -Gen besaßen. Bei differenzierter Betrachtung der Stx2e-Konzentration in BB-Lysat- bzw. Kulturüberständen in Bezug zum Virulenzgenprofil der Stämme fielen jedoch Unterschiede auf. EDEC-Stämme enthielten signifikant mehr Stx2e im BB-Lysatüberstand ( $p < 0,001$ ) als EDEC/ETEC- ( $stx_{2e}^+$ ,  $fedA^+$ , zusätzliche Gene für Enterotoxine) und sonstige STEC-2e-Stämme. Umgekehrt konnten signifikant höhere Stx2e-Konzentrationen in Kulturüberständen solcher Stämme detektiert werden, die nicht zu den EDEC gehörten ( $p < 0,001$ ). Auch beim Vergleich der Stx2e-Konzentrationen von F18-kodierenden Stämmen mit denen von F18-negativen Stämmen wurden Unterschiede deutlich: Der Gehalt an zellassoziiertem Stx2e war bei F18-positiven Stämmen signifikant größer als bei F18-negativen Stämmen, bei denen das Stx2e eher frei im Kulturüberstand vorlag ( $p < 0,001$ , **Abbildung 13**). Außerdem enthielten Stämme von Ferkeln, welche laut Vorbericht Anzeichen der Ödemkrankheit gezeigt hatten, signifikant höhere Mengen an zellassoziiertem Stx2e sowie an Gesamt-Stx2e als Stämme von Tieren ohne Ödemkrankheit (jeweils  $p < 0,001$ , **Abbildung 12**).

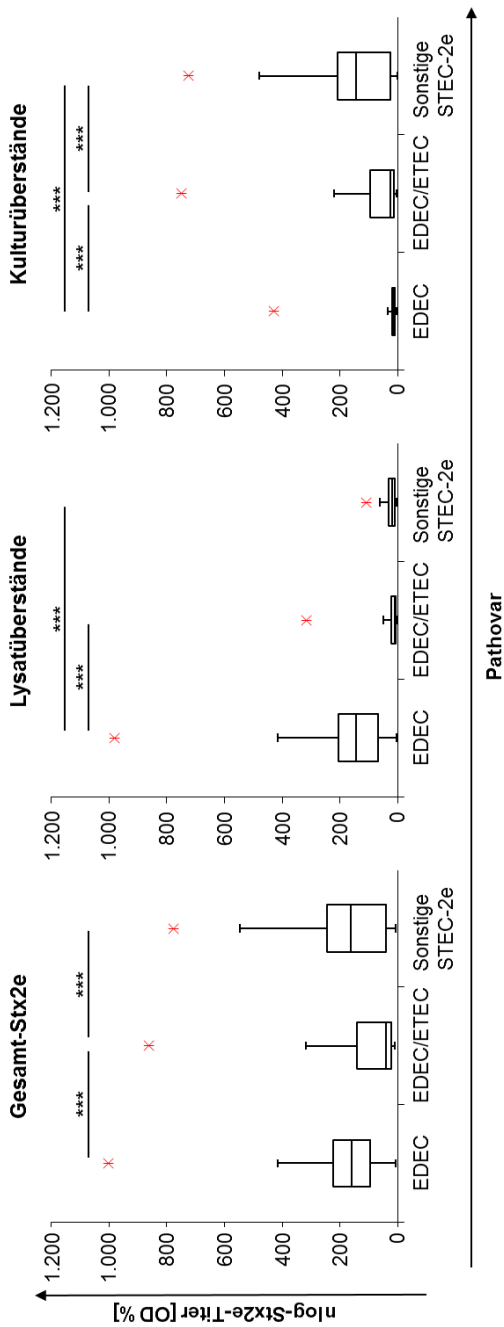
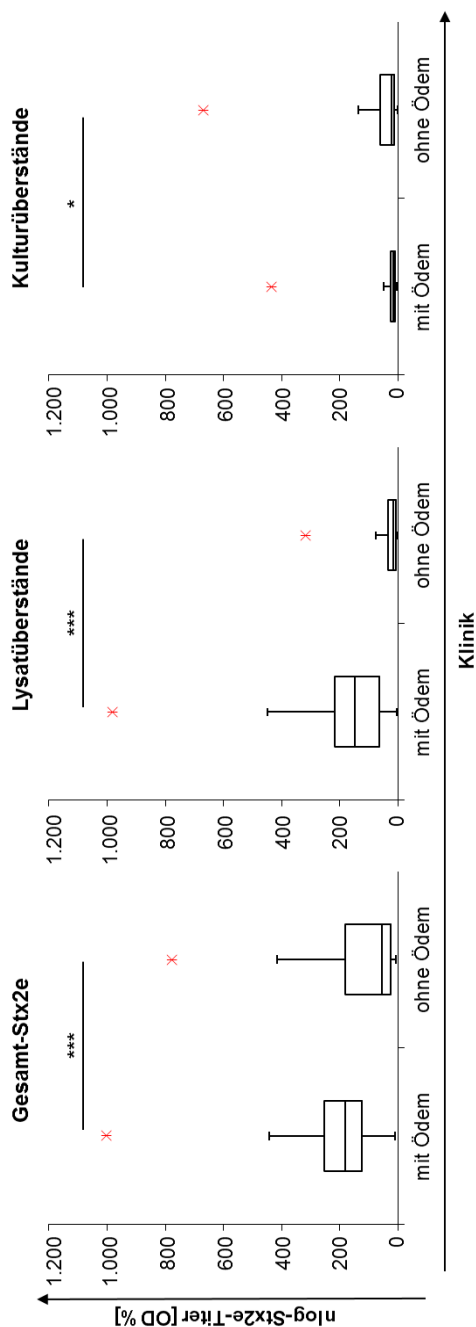


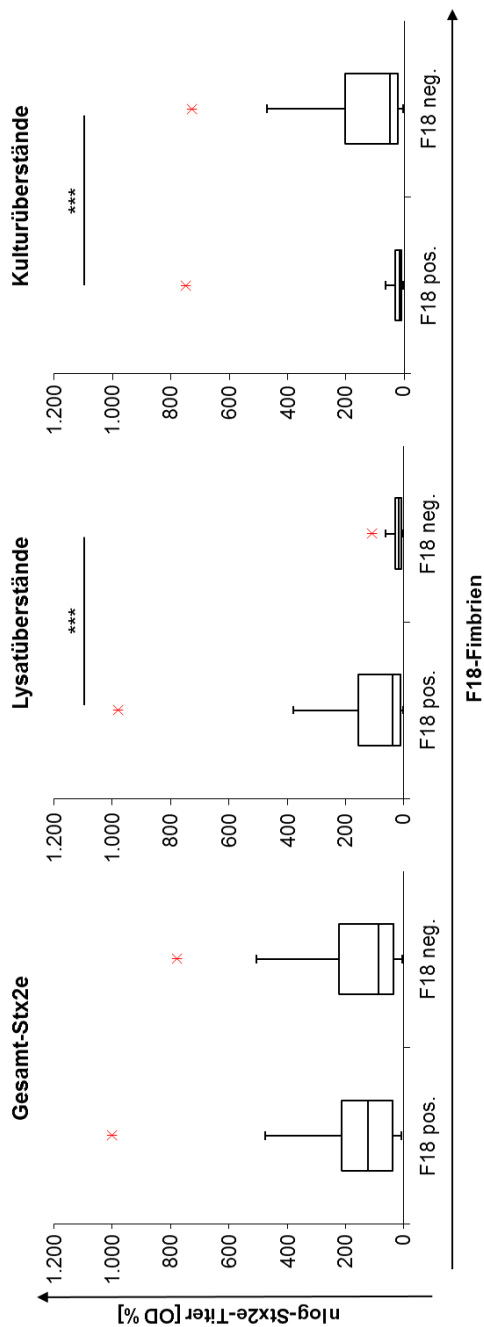
Abbildung 11: Stx2e-Bildung unter Standardanzuchtbedingungen in Bezug zur Klassifikation der Stämme als EDEC, EDEC/I/ETEC oder sonstige STEC-2e (Stx2e-ELISA-Ergebnisse).

Box-Whisker-Diagramme, Länge der "Whisker" beträgt max. das 1,5-Fache des Interquartilabstandes. Der Median der Daten ist durch eine horizontale Linie innerhalb der "Box" markiert. Statistisch signifikante Mittelwertunterschiede ( $p \leq 0,001$ , Varianzanalyse mit Scheffé-Prozedur) sind durch \*\*\* markiert. EDEC (*E. coli* stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>, fedA<sup>+</sup>, n = 178), EDEC/I/ETEC (*E. coli* stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>, fedA<sup>+</sup>, mindestens ein Enterotoxigen, n = 129); sonstige STEC-2e (*E. coli* stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>, n = 46). Das Gesamt-Stx2e wurde durch Addition der nlog-Stx2e-Titer von BB-Lysat- und Kulturüberstand jedes Stammes errechnet. Maximale Ausreißer sind mit x markiert. Bei der Analyse wurden 353/365 Stämmen berücksichtigt, da nur diese die entsprechenden Virulenzgene aufwiesen.



**Abbildung 12: Stx2e-Bildung unter Standardanzuchtbedingungen in Bezug zu klinischen Anzeichen der Ödemkrankheit** (Stx2e-ELISA-Ergebnisse).

Box-Whisker-Diagramme, Länge der "Whisker" beträgt max. das 1,5-Fache des Interquartilsabstandes. Der Median der Daten ist durch eine horizontale Linie innerhalb der "Box" markiert. Statistisch signifikante Mittelwertunterschiede sind durch \*\*\* ( $p < 0,001$ , t-Test) bzw. durch \* ( $p < 0,05$ , t-Test) markiert. **Klinik** Erkrankung laut Vorbericht, **mit Ödem** klinische Anzeichen der Ödemkrankheit ( $n = 105$ ), **ohne Ödem** ohne klinische Anzeichen der Ödemkrankheit ( $n = 190$ ). Das Gesamt-Stx2e wurde durch Addition der nlog-Stx2e-Titer von BB-Lysat- und Kulturüberstand jedes Stammes errechnet. Maximale Ausreißer sind mit \* markiert. Bei der Analyse wurden 295/365 Stämmen berücksichtigt, da nur für diese vorberichtliche Angaben existierten.



**Abbildung 13: Stx2e-Bildung unter Standardanzuchtbedingungen in Bezug zum Vorkommen von F18-Fimbrien bei STEC-2e-Feldstämmen (Stx2e-ELISA-Ergebnisse).**

Box-Whisker-Diagramme, Länge der "Whisker" beträgt max. das 1,5-Fache des Interquartilsabstandes. Der Median der Daten ist durch eine horizontale Linie innerhalb der "Box" markiert. Statistisch signifikante Mittelwertunterschiede sind durch \*\*\* ( $p < 0,001$ , t-Test) markiert. **F18 pos.** Strukturen für F18-Fimbrienprotein (*fedA*) mittels Multiplex-PCR nachgewiesen ( $n = 307$ ), **F18 neg.** Strukturen für F18-Fimbrienprotein (*fedA*) mittels Multiplex-PCR nicht nachgewiesen ( $n = 58$ ). Das Gesamt-Stx2e wurde durch Addition der nlog-Stx2e-Titer von BB-Lysat- und Kulturüberstand jedes Stammes errechnet. Maximale Ausreißer sind mit **x** markiert.



#### 4.3.2 Stx2e-Nachweis mit dem Verozell-Zytotoxizitätstest

Zusätzlich zum Stx2e-Nachweis mittels Stx2e-ELISA wurden BB-Lysat- und Kulturüberstände der *E. coli*-Stämme mit dem Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) auf das Vorhandensein von biologisch aktivem Stx2e untersucht.

##### Bestimmung von Cut-Off-Werten

Für den Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) wurde - analog zum Stx2e-ELISA - jeweils ein Cut-Off für die Kultur- und die BB-Lysatüberstände bestimmt. Dazu wurden die zehn *stx*<sub>2e</sub>-negativen *E. coli*-Stämme, die bereits zur Berechnung der ELISA-Cut-Offs verwendet worden waren (siehe 4.2 bzw. **Tabelle 14**), herangezogen. BB-Lysat- und Kulturüberstände der zehn Stämme wurden jeweils im Doppelansatz in 0,89 %-iger NaCl-Lösung über 8 log<sub>2</sub>-Stufen titriert, wobei jede Probe unverdünnt in die erste Titrationsstufe eingesetzt wurde. Bei den Kulturüberständen aller *stx*<sub>2e</sub>-negativen Stämme lag die ermittelte Zytotoxizität unter der Nachweisgrenze von 20 CD<sub>50</sub>/ml. Der Cut-Off für Kulturüberstände wurde daher auf 20 CD<sub>50</sub>/ml festgesetzt.

Die mittels BugBuster® Protein Extraction Reagent aufgeschlossenen Bakterienzell-Fractionen (BB-Lysatüberstände) der zehn Stämme zeigten im Vero-ZT eine unterschiedlich hohe, unspezifische Zytotoxizität (163,7 bis 469,1 CD<sub>50</sub>/ml).

Der Cut-Off für BB-Lysatüberstände wurde deshalb auf 457,6 CD<sub>50</sub>/ml festgelegt. Dieser Wert ergab sich durch Berechnung des arithmetischen Mittelwerts der zehn BB-Lysatüberstände mit anschließender Addition der zweifachen Standardabweichung (siehe **Tabelle 16** und **Tabelle 17**). Somit betrug der Cut-Off für BB-Lysatüberstände das mehr als 20-Fache des Cut-Offs für Kulturüberstände.

**Tabelle 16: Messwerte von *stx*<sub>2e</sub>-negativen *E. coli*-Stämmen im Vero-ZT**

<i>E. coli</i> -Stamm	Virulenzgene	Zytotoxizität [CD <sub>50</sub> /ml]	
		Kulturüberstand	Lysatüberstand
P1766/01-1	<i>fedA, estb, elt</i>	< 20,0	185,7
P6180/00	<i>fedA, estb, elt</i>	< 20,0	223,9
P2672/04-2	neg.	< 20,0	183,0
838/05	<i>fim41A</i>	< 20,0	167,1
P929/01-1	<i>faeG, estb, elt</i>	< 20,0	403,3
3848/03	<i>faeG, estb, elt</i>	< 20,0	469,1
P3261/04-1	<i>faeG, estb, elt</i>	< 20,0	264,2
P5670/04-3	<i>fanA, fim41A, estap</i>	< 20,0	222,0
P0695/01-2	<i>fanA, estap</i>	< 20,0	214,0
987P	<i>fasA, estap</i>	< 20,0	163,7
<b>MW</b>		< 20,0	<b>249,6</b>
<b>SD</b>		n. b.	<b>104,0</b>

**Erläuterungen:** **Lysatüberstand** BugBuster®-Lysatüberstand; **MW** arithmetischer Mittelwert; **n. b.** nicht berechnet; **neg.** keine Virulenzgene mittels Multiplex-PCR nach Casey und Bosworth (2009) nachweisbar; **SD** Standardabweichung

**Tabelle 17: Cut-Off-Werte für die quantitative Bestimmung von Stx2e mittels Vero-ZT**

Probenmaterial	Cut-Off	
	Definition	Wert [CD <sub>50</sub> /ml]
<b>Kulturüberstand</b>	MW + 2 x SD	20,0
<b>Lysatüberstand</b>	MW + 2 x SD	457,6

**Erläuterungen:** **Lysatüberstand** BugBuster®-Lysatüberstand; **MW** arithmetischer Mittelwert der Messwerte 10 *stx*<sub>2e</sub>-negativer *E. coli*-Stämme; **SD** Standardabweichung

### Stx2e-Konzentration in Kulturüberständen von STEC-2e-Feldstämmen

Die Kulturüberstände waren nach Anzucht der Stämme unter Standardbedingungen (siehe **Kapitel 3.6**) gewonnen und bereits im Stx2e-ELISA getestet worden (siehe **Kapitel 4.3.1**). Im Vero-ZT betrug ihre zytotoxische Aktivität zwischen 23 und 8.292 CD<sub>50</sub>/ml. Bezüglich der Stx2e-Bildung war also eine ähnlich breite Streuung zu beobachten wie im Stx2e-ELISA.

Aber im Gegensatz zum Stx2e-ELISA, mit welchem in den Kulturüberständen von 286/365 Stämmen (78,4 %) kein Stx2e nachgewiesen worden war, reagierten im Vero-ZT nur acht (2,2 %) von insgesamt 365 Stämmen Stx2e-negativ. So konnte in den Kulturüberständen der Stämme P8226/00-4, 2692/02-2, P6574/02-1, 4963/03-2, P203/05-1, 763/05-1, P2731/06-2 und P3982/1/06-1 kein aktives Stx2e nachgewiesen werden. Bei weiteren 238 Stämmen (65,2 %) lag die zytotoxische Aktivität in dem niedrigen Bereich von 20 bis 500  $CD_{50}/ml$ . Nur 119 von 365 Stämmen (32,6 %) wiesen einen Toxingehalt von über 500  $CD_{50}/ml$  auf. Von diesen 119 Stämmen erzielten 45 Stämme Werte zwischen 500 und 1.000  $CD_{50}/ml$ , 68 Stämme Werte zwischen 1.000 und 4.000  $CD_{50}/ml$  und lediglich sechs Stämme eine zytotoxische Aktivität von über 4.000  $CD_{50}/ml$ . Die Werte der beiden positiven Kontrollstämmen humanen Ursprungs lagen bei 4.304  $CD_{50}/ml$  (Stamm 2771/97;  $stx_{2e}^{+}$ ) und 10.052  $CD_{50}/ml$  (Stamm EDL 933;  $stx_{2a}^{+}$ ). Ein Vergleich der Ergebnisse von Stx2e-ELISA und Vero-ZT ist in der **Tabelle 18** dargestellt.

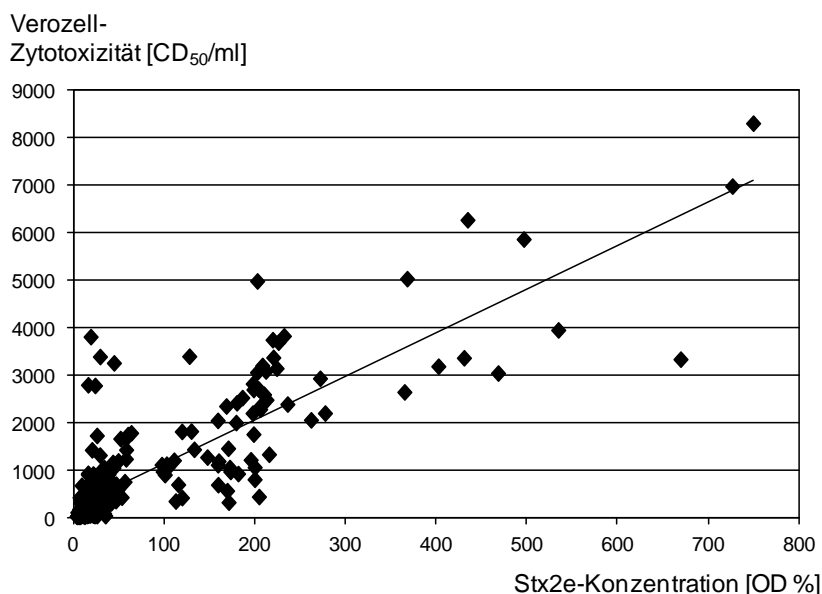
**Tabelle 18: Vergleich der Reaktionen von Kulturüberständen der STEC-2e-Feldstämmen im Stx2e-ELISA und im Vero-ZT**

Ergebnis im Stx2e-ELISA	Anzahl der Stämme		
	Ergebnis im Vero-ZT		Zeilensumme
	negativ	positiv	
negativ	8	278	286
positiv	0	79	79
Spaltensumme	8	357	365

#### 4.3.3 Korrelation zwischen den Ergebnissen aus dem Stx2e-ELISA und dem Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT)

Wie die **Abbildung 14** zeigt, korrelierten die Messwerte, die für die Stx2e-Konzentration in Kulturüberständen mit dem Stx2e-ELISA bzw. dem Vero-ZT ermittelt worden waren, signifikant miteinander ( $p < 0,001$ ). Insgesamt waren bei Stämmen, bei denen mit dem Stx2e-ELISA höhere Stx2e-Konzentrationen ermittelt worden waren, auch höhere Werte der zytotoxischen Aktivität festzustellen. Die Zytotoxizität aller Kulturüberstände, die mit dem Stx2e-ELISA als positiv eingestuft wurden, lag über 300  $CD_{50}/ml$  und betrug damit ca. das 15-Fache des für den Vero-ZT gültigen Cut-Off-Wertes. Von den 286 Stämmen, deren Kulturüberstände im Stx2e-ELISA ein negatives Resultat lieferten (nlog-Stx2e-Titer  $\leq 44,70$  OD %), betrug bei 240 Stämmen (83,9 %) die zytotoxische Aktivität weniger als 500  $CD_{50}/ml$ , bei 173 dieser 240 Stämme (72,1 %) war die Zytotoxizität sogar kleiner als

300 CD<sub>50</sub>/ml. Unter Verwendung der Regressionsgleichung (siehe **Abbildung 14**) wurde für den Stx2e-ELISA eine Nachweisgrenze von 622 CD<sub>50</sub>/ml ermittelt, was ca. dem 30-Fachen der Nachweisgrenze des Vero-ZT entsprach. Von den 286 Stx2e-ELISA-negativen Kulturüberständen besaßen dennoch 36 Stämme (12,6 %) eine zytotoxische Aktivität von mehr als 622 CD<sub>50</sub>/ml, bei 12 dieser 36 Stämme betrug die Zytotoxizität sogar mehr als 1.000 CD<sub>50</sub>/ml. Bei Stämmen, deren nlog-Stx2e-Titer über 400 OD % lag, streuten die Werte für die Zytotoxizität [CD<sub>50</sub>/ml] stark.



**Abbildung 14:** Korrelation zwischen den Messwerten in dem Stx2e-ELISA (nlog-Stx2e-Titer) und in dem Verozell-Zytotoxizitätstest für die Kulturüberstände aus der Anzucht von 365 STEC-2e-Stämmen unter Standardbedingungen

Korrelationskoeffizient (Pearson): 0,850

Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ): 0,723

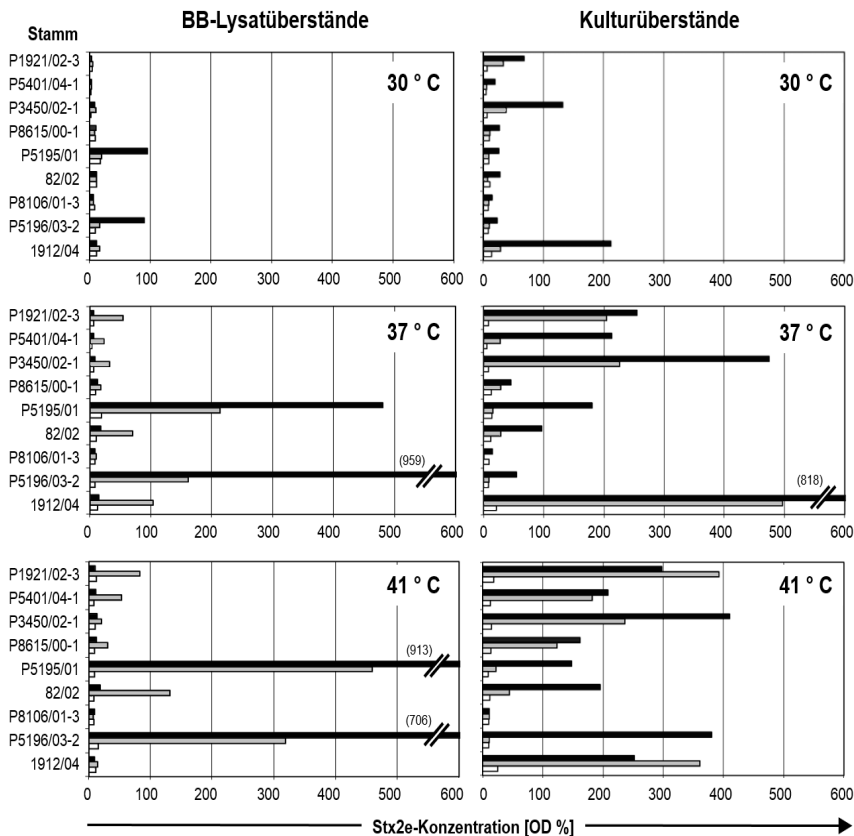
Regressionsgerade:  $y = 9,2 \cdot x + 210,8$

#### 4.4 Einfluss von exogenen Faktoren auf die Stx2e-Freisetzung bei porcinen STEC-2e-Feldstämmen

##### 4.4.1 Einfluss der Inkubationstemperatur und -dauer

Um den Einfluss der Bebrütungstemperatur und der Dauer der Bebrütung auf die Stx2e-Bildung der *E. coli*-Stämme zu ermitteln, wurden neun STEC-2e-Stämme jeweils bei 23 °C, 30 °C, 37 °C sowie 41 °C im Schüttelbrutschrank (aerob, 180 rpm) inkubiert. Nach 1 h, 5 h sowie nach 24 h wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) gemessen und ein Aliquot der Kultur entnommen, um anschließend mit dem Stx2e-ELISA die Stx2e-Konzentration sowohl im BB-Lysat- als auch im Kulturüberstand zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Inkubation bei 30 °C, 37 °C und 41 °C sind in der **Abbildung 15** dargestellt. Dabei wurde auf die Ergebnisse aus der Bebrütung bei 23 °C verzichtet, da bei dieser Temperatur kaum Stx2e nachweisbar war. In der Tendenz nahm die Stx2e-Konzentration in den BB-Lysat- bzw. Kulturüberständen mit steigender Bebrütungstemperatur und steigender Bebrütungsdauer zu. Allerdings bestanden deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen. So wurde bei den Stämmen P5195/01 und P5196/03-2 bei 30 °C, 37 °C und bei 41 °C nach 24-stündiger Inkubation sowohl im BB-Lysat- als auch im Kulturüberstand mehr Stx2e nachgewiesen als nach 5 h. Bei den anderen 7 Stämmen war dagegen nach 24 Stunden nur dann in den Kulturüberständen mehr Stx2e vorhanden als nach 5 h, wenn die Inkubation bei 30 °C oder bei 37 °C erfolgt war. Bei dem Stamm P1921/02-3 war das meiste Stx2e nach 5-stündiger Inkubation bei 41 °C im Kulturüberstand nachweisbar. In den BB-Lysatüberständen der Stämme P1921/02-3, P5401/04-1, P3450/02-1, P8615/00-1, 82/02 und 1912/04 wurde nach 5-stündiger Inkubation bei 37 °C bzw. bei 41 °C eine höhere Stx2e-Konzentration erreicht als nach 1 h oder 24 h. Bei diesen Stämmen war dann nach 24 h bei den genannten Temperaturen in den Kulturüberständen die höchste Stx2e-Konzentration messbar. Ausnahmen bildeten die Stämme P1921/02-3 und 1912/04, in deren Kulturüberständen die höchste Stx2e-Konzentration nach 5-stündiger Bebrütung bei 41 °C erzielt wurde.



**Abbildung 15: Einfluss der Bebrütungstemperatur und -dauer auf die Stx2e-Konzentration in BB-Lysat- und Kulturüberständen von neun Stx2e-kodierenden *E. coli*-Stämmen**

Die Stx2e-Konzentration wurde mit dem Stx2e-ELISA ermittelt und ist als nlog-Stx2e-Titer abgebildet.

**Weißer Balken:** 1 h Inkubationszeit (IKZ); **grauer Balken:** 5 h IKZ; **schwarzer Balken:** 24 h IKZ

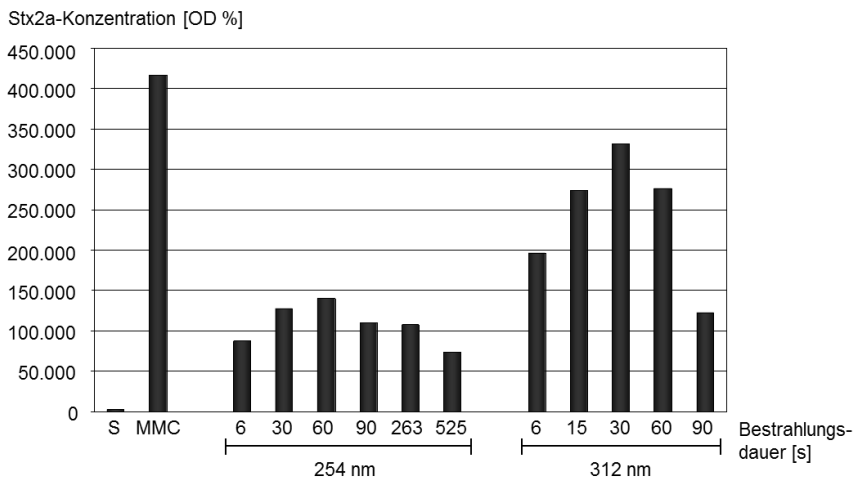
#### 4.4.2 Einfluss von UV-Licht, Mitomycin C und Antiinfektiva

Um den Einfluss von UV-Licht, Mitomycin C oder Antiinfektiva auf die Stx2e-Bildung zu untersuchen, wurden 30 ausgewählte STEC-2e-Feldstämme sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Einwirkung dieser Faktoren angezüchtet. Nach der Anzucht wurde die Stx2e-Konzentration in den Kulturüberständen mit dem Stx2e-ELISA bestimmt. Die unter dem Einfluss eines Faktors gebildete Stx2e-Menge wurde aber nur dann als Zunahme interpretiert, wenn (1) ihre Konzentration im Kulturüberstand mehr als 110 % der nach Standardanzucht gemessenen Stx2e-Konzentration entsprach und (2) dieser nlog-Stx2e-Titer auch den Cut-Off des Stx2e-ELISA überschritt. Eine Abnahme lag vor, wenn die fragliche Stx2e-Konzentration kleiner als 90 % der nach Standardanzucht detektierten Stx2e-Konzentration war. Die Stx2e-Konzentration in der Kultur der mit UV-Licht, Mitomycin C oder einem Antiinfektivum behandelten Bakterien wurde als Vielfaches (n-fach, siehe **Abbildung 17** sowie **Tabelle 22**) der nach Standardanzucht enthaltenen Stx2e-Konzentration ausgedrückt. Die Stx2e-Konzentration wurde dabei stets als nlog-Stx2e-Titer [OD %] angegeben.

##### 4.4.2.1 Einfluss von UV-Licht

Bevor der Einfluss von UV-Licht auf die Stx2e-Bildung an den 30 repräsentativen STEC-2e-Stämmen untersucht wurde, wurde zunächst an dem EHEC-Stamm EDL 933 diejenige Bestrahlungsdauer und -dosis bestimmt, bei der dieser am meisten Stx2a freisetzte. Dazu wurde der Stamm unterschiedlich lange UV-Licht zweier verschiedener Wellenlängen ausgesetzt. Zum einen wurde er für 6, 30, 60, 90, 263 sowie 525 s in einer UV-Kammer von oben mit Licht der Wellenlänge von 254 nm bestrahlt, wobei der Abstand zwischen UV-Quelle und Kultur 20 cm betrug. Im zweiten Versuchsansatz wurde die Kultur des Stammes auf einem UV-Leuchttisch für 6, 15, 30, 60 und 90 s mit Licht der Wellenlänge von 312 nm von unten bestrahlt. Die Kultur befand sich dabei in einer Petrischale aus klarem Kunststoff. Zum Vergleich wurde eine weitere Kultur des Stammes mit Mitomycin C behandelt (f. c. 0,5 µg/ml). Parallel wurde eine dritte Kultur unter Standardanzuchtbedingungen inkubiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 16** dargestellt.

Sowohl UV-Licht als auch Mitomycin C stimulierten den Stamm EDL 933 zur verstärkten Bildung und/oder Freisetzung von Stx2a. Das UV-Licht war am stärksten wirksam, wenn es eine Wellenlänge von 312 nm hatte und für 30 s einwirkte. Höher war der Stx2a-Titer in der Kultur nur dann, wenn dieser Mitomycin C zugesetzt worden war. Aufgrund der mit dem Stamm EDL 933 erzielten Ergebnisse wurden die 30 STEC-2e-Stämme ebenfalls für 30 s auf dem 312 nm-UV-Leuchttisch bestrahlt, um die Wirkung von UV-Licht zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in der **Abbildung 17** sowie in der **Tabelle 22** dargestellt.



**Abbildung 16: Stx2a-Konzentration in Kulturüberständen des EHEC-Stammes EDL 933 in Abhängigkeit von verschiedenen Dosen UV-Licht (Stx2e-ELISA-Ergebnisse, nlog-Stx2a-Titer)**

**MMC:** Eine weitere Kultur des Stammes wurde für 5 h unter Zusatz von Mitomycin C (f. c. 0,5 µg/ml) inkubiert

**S:** Eine weitere Kultur des Stammes wurde für 5 h unter Standardanzuchtbedingungen inkubiert

**254 nm, 312 nm:** UV-Wellenlänge des von den verwendeten Lichtquellen emittierten UV-Lichts

Die UV-Bestrahlung induzierte bei 4 von 30 Stämmen (13,3 %) einen Anstieg von Stx2e in den Kulturüberständen (P5196/03-2, P5194/03-2, P868/02 und P5413/04-1). Bei dem Stamm P868/02 war dieser Anstieg am stärksten (50,8-fache Stx2e-Konzentration). Bei 2 Stämmen (299 und P4470/03-1) waren die gemessene Stx2e-Konzentrationen in den Kulturüberständen zwar um ein Mehrfaches größer als nach Inkubation unter Standardanzuchtbedingungen, die Messwerte übertrafen aber nicht den Stx2e-ELISA-Cut-Off. Bei 22 von 30 Stämmen (73,3 %) war nach der UV-Bestrahlung weniger Stx2e im Kulturüberstand vorhanden als unter Standardanzuchtbedingungen. Die im Kulturüberstand nachgewiesene Stx2e-Konzentration der Stämme 4946/00 und 1485/03 blieb unbeeinflusst. Die 4 Stämme, deren Kulturüberstände nach UV-Bestrahlung mehr Stx2e enthielten als ohne Behandlung, waren aufgrund ihrer Virulenzgene als EDEC klassifiziert worden. Der Stamm P5413/04-1 besaß zusätzlich das Gen für den Fimbrientyp F4 (*faeG*<sup>+</sup>, siehe **Abbildung 17** sowie **Tabelle 22**).

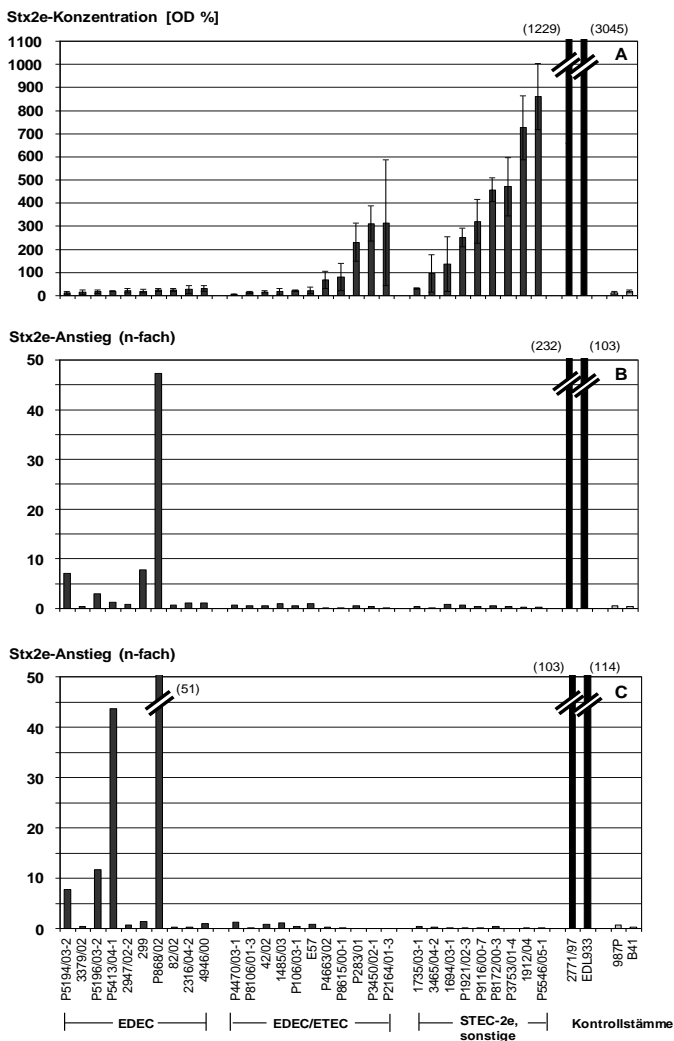


#### 4.4.2.2 Einfluss von Mitomycin C

Um den Einfluss von Mitomycin C auf die Stx2e-Bildung bei 30 ausgewählten STEC-2e-Stämmen zu untersuchen, wurde jeder Stamm als Schüttelkultur angezüchtet (aerob, 180 rpm, 37 °C). Sobald die OD<sub>600</sub> der Kultur zwischen 0,3 und 0,4 lag, wurde die Kultur aufgeteilt. Einem Ansatz wurde Mitomycin C hinzugefügt (f. c. 0,5 µg/ml), der andere Ansatz wurde nicht behandelt. Nach 5-stündiger Inkubation (aerob, 180 rpm, 37 °C) wurden die Kulturüberstände beider Kulturen gewonnen und darin die Stx2e-Konzentration bestimmt.

Bei 5 von 30 Stämmen (16,7 %; Stämme P5194/03-2, P5196/03-2, 299, P868/02 und 4946/00) enthielten die Kulturüberstände nach Einwirkung von Mitomycin C mehr Stx2e als die unter Standardanzuchtbedingungen erzeugten Kulturüberstände (**Abbildung 17**). Wie beim UV-Licht reagierte der Stamm P868/02 am stärksten (47,3-fache Stx2e-Konzentration). Alle 5 Stämme waren als EDEC klassifiziert. Auch unter der Einwirkung von Mitomycin C war bei 2 Stämmen (2316/04-1 und P5413/04-1) nach Exposition zwar eine größere Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand zu verzeichnen, jedoch ohne dass der Stx2e-ELISA-Cut-Off überschritten wurde. Bei 3 weiteren Stämmen blieb der Gehalt an Stx2e unbeeinflusst, während bei 20 von 30 Stämmen (66,7 %) die Stx2e-Konzentration nach Einwirkung von Mitomycin C geringer war.

Bei 25 von 30 Stämmen (83,3 %) führte die Behandlung mit UV-Licht und Mitomycin C zu einer gleichsinnigen Reaktion im Hinblick auf die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand. Dabei reagierten 5 von 30 Stämmen (16,7 %; Stämme P5194/03-2, P5196/03-2, 299, P868/02 und P5413/04-1) auf beide Faktoren mit der verstärkten Bildung und/oder Freisetzung von Stx2e. Bei insgesamt 8 von 30 Stämmen (26,7 %) wirkte damit wenigstens einer der beiden Faktoren stimulierend. Dabei reagierte der Stamm P868/02 bei beiden Faktoren am stärksten (47,3-fache Stx2e-Konzentration durch Mitomycin C bzw. 50,8-fache Stx2e-Konzentration durch UV-Licht). Bei 4 von 5 Stämmen, die sowohl auf Mitomycin C als auch auf das UV-Licht mit dem Anstieg der Stx2e-Konzentration reagierten, war das UV-Licht stärker wirksam als das Mitomycin C. Bei 19 von 30 Stämmen (63,3 %) führten sowohl Mitomycin C als auch UV-Licht zu geringeren Stx2e-Konzentrationen im Kulturüberstand. Dagegen ließen beide Faktoren die Stx2e-Konzentration in der Kultur von Stamm 1485/03 unbeeinflusst.



**Abbildung 17: Stx2e-Konzentration in Kulturüberständen von STEC-2e-Feldstämmen unter Standardanzuchtbedingungen (A) sowie unter dem Einfluss von Mitomycin C (B) oder UV-Licht (C) (Stx2e-ELISA-Ergebnisse)**

**A:** nlog-Stx2e-Titer (arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils 3 Messungen). Beim Stamm EDL 933 handelt es sich um den nlog-Stx2a-Titer.

**B bzw. C:** Jeder Balken repräsentiert das n-Fache der Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand des betreffenden Stammes (Stx2a-Konzentration beim Stamm EDL 933) nach Einwirkung von Mitomycin C (B) oder UV-Licht (C) im Vergleich zur Stx2e-Konzentration im unter Standardanzuchtbedingungen erzeugten Kulturüberstand. Begriffe **EDEC**, **EDEC/ETEC**, **sonstige STEC-2e** siehe **Tabelle 12**

#### 4.4.2.3 Einfluss von Antiinfektiva

Die Untersuchung des Einflusses von Antiinfektiva auf die Stx2e-Bildung erfolgte ebenfalls an den 30 ausgewählten STEC-2e-Stämmen. Dazu wurde jeder dieser Stämme in einer Schüttelkultur angezüchtet (aerob, 180 rpm, 37 °C). Sobald die OD<sub>600</sub> der Kultur zwischen 0,3 und 0,4 lag, wurde die Kultur aufgeteilt. Während einem Ansatz das zu untersuchende Antiinfektivum hinzugefügt wurde, diente der andere Ansatz als nicht behandelte Kontrolle. Nach erneuter Inkubation (aerob, 180 rpm, 37 °C, 5 h) wurden die Kulturüberstände beider Kulturen geerntet und darin die Stx2e-Konzentration bestimmt. Die jeweilige Antiinfektivum-Dosis, denen die Bakterien ausgesetzt wurden, richtete sich an der MHK des Wirkstoffs gegenüber dem jeweiligen *E. coli*-Stamm aus. Die MHKs wurden dazu in einer vorhergehenden Versuchsreihe bestimmt.

#### Minimale Hemmkonzentration gegenüber den STEC-2e-Feldstämmen

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Antiinfektiva Amoxicillin, Colistin, Enrofloxacin, Erythromycin, Neomycin und Tetrazyklin sowie des zytostatischen Antibiotikums MMC wurde mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode gemäß den CLSI-Vorschriften bestimmt. Die Ergebnisse der 30 ausgewählten STEC-2e-Stämme sind in der **Tabelle 19** aufgelistet.

Nach den ermittelten MHK-Werten waren alle getesteten STEC-2e-Stämme resistent gegenüber Erythromycin, 70 % resistent gegenüber Tetrazyklin und 50 % resistent gegenüber Amoxicillin. Deutlich weniger Stämme zeigten Resistenzen gegenüber Colistin (37 %) oder Neomycin (27 %). Alle getesteten Stämme waren sensibel gegenüber Enrofloxacin, und zwar in einem solchen Ausmaß, dass der Messbereich für dieses Antiinfektivum nach unten erweitert werden musste (5 log<sub>2</sub>-Stufen), damit die MHK überhaupt zu bestimmen war. Bei Amoxicillin waren die MHK-Werte der resistenten und sensiblen Stämme besonders stark verschieden. Resistente Stämme (50 %) wiesen ausschließlich MHK-Werte an der Obergrenze des Konzentrationsbereichs oder darüber auf (> 256 µg/ml). Sensible Stämme erzielten dagegen MHK-Werte von maximal 2 µg/ml. Bezüglich der MHK für Enrofloxacin stellten sich die Stämme sehr homogen dar: 25/30 Stämmen (83,3 %) erzielten MHK-Werte von 0,008 bzw. 0,015 µg/ml. Die ermittelten MHK<sub>50</sub>- bzw. MHK<sub>90</sub>-Werte für die Feldstämmen sind in der **Tabelle 21** aufgeführt. Die beiden *E. coli*-Kontrollstämmen tierischer Herkunft waren gegenüber allen Antiinfektiva mit Ausnahme von Erythromycin sensibel. Nur gegenüber Colistin zeigte sich der Stamm B41 intermediär. Die *E. coli*-Kontrollstämmen humanen Ursprungs waren gegenüber den Antiinfektiva, für die *breakpoints* existierten, als sensibel einzustufen (siehe **Tabelle 20**).

**Tabelle 19: Ergebnisse der MHK-Bestimmung bei den 30 getesteten STEC-2e-Stämmen**

Stamm	Minimale Hemmkonzentration (MHK) [ $\mu\text{g/ml}$ ]						
	AMX	COL	EM	ENR	NEO	TC	MMC
P5196/03-2	> 256	8	8	0,008	256	256	0,25
P5194/03-2	> 256	16	32	0,008	256	256	0,25
P2164/01-3	> 256	16	32	0,250	64	> 256	1
P283/01	256	16	16	0,125	64	> 256	0,50
P8106/01-3	> 256	8	16	0,015	64	256	2
P868/02	256	8	32	0,008	1	128	1
P106/03-1	> 256	8	32	0,015	2	128	2
2947/02-2	256	1	64	0,015	64	256	1
P5546/05-1	256	1	16	0,015	64	256	2
82/02	256	2	32	0,015	4	64	0,50
P3753/01-4	256	2	32	0,008	1	256	0,25
P5413/04-1	> 256	1	16	0,008	4	128	2
P4663/02	256	1	16	0,015	2	64	1
3465/04-2	2	4	32	0,015	4	128	0,50
1485/03	2	4	16	0,008	2	64	1
299	1	0,5	8	0,008	2	128	0,25
1912/04	2	2	64	0,015	2	256	1
1735/03-1	4	2	8	0,008	1	256	0,50
P1921/02-3	1	2	64	0,015	2	256	4
2316/04-2	4	1	16	0,008	1	128	2
P8172/00-3	2	2	16	0,015	2	128	2
42/02	> 256	4	32	0,030	1	4	4
P9116/00-7	> 256	2	32	0,015	256	0,5	1
P4470/03-1	2	8	16	0,125	2	2	1
E57	2	1	32	0,015	1	2	0,50
P3450/02-1	2	2	16	0,060	1	2	0,25
1694/03-1	1	2	32	0,015	2	1	4
4946/00	4	2	16	0,008	1	2	2
3379/02	2	1	16	0,008	4	1	4
P8615/00-1	2	1	32	0,015	2	4	2

**Erläuterungen:** **AMX** Amoxicillin; **COL** Colistin; **EM** Erythromycin; **ENR** Enrofloxacin; **MMC** Mitomycin C; **NEO** Neomycin; **TC** Tetrazyklin.

**rot** resistente Stämme; **grün** intermediäre Stämme; **schwarz** sensible Stämme  
*breakpoints* von AVID (2000), außer bei Erythromycin und Tetrazyklin (*breakpoints* von CLSI (2002)). Bei MMC wurde keine Einteilung in sensibel, intermediär oder resistent vorgenommen.

**Tabelle 20: Ergebnisse der MHK-Bestimmung bei den *E. coli*-Kontrollstämmen**

Stamm	Minimale Hemmkonzentration (MHK) [ $\mu\text{g/ml}$ ]						
	AMX	COL	EM	ENR	NEO	TC	MMC
EDL 933	4	2	32	0,015	1	2	0,50
2771/97	2	2	32	0,008	1	2	1
987P	2	0,5	64	0,015	4	1	2
B41	2	2	32	0,008	2	1	0,50

**Erläuterungen:** **AMX** Amoxicillin; **COL** Colistin; **EM** Erythromycin; **ENR** Enrofloxacin; **MMC** Mitomycin C; **NEO** Neomycin; **TC** Tetrazyklin.

**rot** resistente Stämme; **grün** intermediäre Stämme; **schwarz** sensible Stämme  
*breakpoints* für die tierischen Isolate 987P und B41 von AVID (2000) außer bei Erythromycin und Tetrazyklin, dort *breakpoints* von CLSI (2002). Für die humanen Isolate EDL 933 und 2771/97 wurden die *breakpoints* von EUCAST (2013) (Amoxicillin und Colistin) bzw. von CLSI (2015) (Tetrazyklin) benutzt. Für Erythromycin, Enrofloxacin und Neomycin existieren keine humanmedizinischen *breakpoints*. Bei MMC wurde keine Einteilung in sensibel, intermediär oder resistent vorgenommen.

**Tabelle 21: MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte der sechs verwendeten Antinfektiva und von MMC bei den 30 getesteten STEC-2e-Stämmen**

	Wirkstoffkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]						
	AMX	COL	EM	ENR	NEO	TC	MMC
MHK <sub>50</sub>	4	2	16	0,008	2	128	1
MHK <sub>90</sub>	> 256	8	32	0,060	64	> 256	4

**Erläuterungen:** Die MHK<sub>50</sub> bzw. MHK<sub>90</sub> ist diejenige Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffs, welche die Vermehrung von mindestens 50 % bzw. 90 % der getesteten Stämme hemmt (Mikits 2004). **AMX** Amoxicillin; **COL** Colistin; **EM** Erythromycin; **ENR** Enrofloxacin; **MMC** Mitomycin C; **NEO** Neomycin; **TC** Tetrazyklin

### Geeignete Wirkstoffdosis zur Prüfung der Antiinfektivawirkung auf die Stx2e-Bildung/-Freisetzung

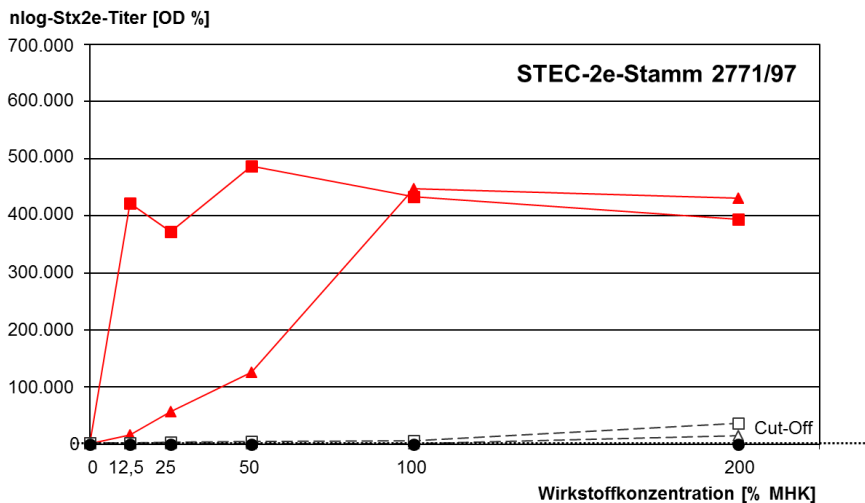
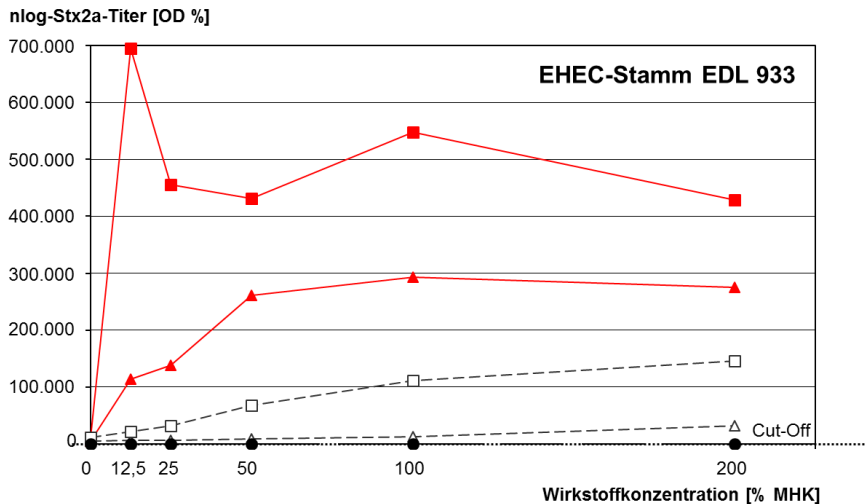
An 5 STEC-2e-Feldstämmen sowie an den Kontrollstämmen EDL 933 und 2771/97 wurde untersucht, welche Dosis der Wirkstoffe Mitomycin C und Enrofloxacin am besten dazu geeignet ist, um die Stx2e- bzw. Stx2a-Bildung und/oder -Freisetzung zu stimulieren. Dazu wurden die Stämme parallel unter Standardbedingungen und unter dem Einfluss verschiedener Wirkstoffkonzentrationen (12,5 %, 25 %, 50 %, 100 % oder 200 % der MHK)

angezüchtet. Nach 1, 2, 3 und 5 h wurden die Kulturüberstände geerntet und deren Stx2e-Konzentration (bzw. Stx2a beim Stamm EDL 933) im Stx2e-ELISA in Form von nlog-Stx2e-Titern (bzw. nlog-Stx2a-Titern beim Stamm EDL 933) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der **Abbildung 18** bis **Abbildung 21** dargestellt. Da Stx2e bei den 5 Feldstämmen weder vor Zugabe eines Wirkstoffs noch nach 1- bzw. 2-stündiger Bebrütung nachweisbar war (nlog-Stx2e-Titer unterhalb des Stx2e-ELISA-Cut-Offs), beschränken sich die Darstellungen auf die Messwerte der 3- und 5-stündigen Bebrütung.

Bei den Kontrollstämmen EDL 933 und 2771/97 induzierte jede der eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen einen Anstieg der Stx2a- bzw. Stx2e-Titer über den Stx2e-ELISA-Cut-Off, wobei die Toxintiter nach 5 h Inkubation höher waren als nach 3 h. Mit Mitomycin C wurden höhere Toxintiter erzielt als mit Enrofloxacin. Der Stamm EDL 933 zeigte unter dem Einfluss von Mitomycin C nach 5 h bei einer Dosis von 12,5 % MHK den höchsten Titer, die Titer von Stamm 2771/97 waren nach 3 h sowie nach 5 h bei 100 % und 200 % der MHK annähernd gleich groß (**Abbildung 18**).

Die 5 getesteten STEC-2e-Feldstämmen reagierten auf Mitomycin C und Enrofloxacin unterschiedlich, wobei selbst die höchsten Stx2e-Titer in keinem Fall die hohen Titerwerte der Kontrollstämmen erreichten. Stx2e-Titer oberhalb des Cut-Offs waren bei den Feldstämmen 299 und P5194/03-2 nur nach 5-stündiger Exposition gegenüber Mitomycin C detektierbar. Der Stx2e-Titer war am höchsten bei 100 % (Stamm 299) bzw. bei 200 % der MHK (Stamm P5194/03-2, **Abbildung 19**).

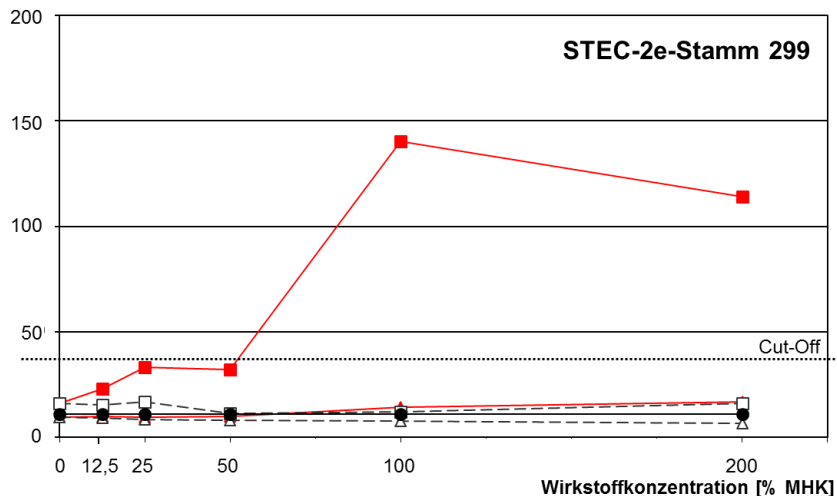
Beim Stamm P868/02 stiegen die Stx2e-Titer sowohl unter Mitomycin C- als auch unter Enrofloxacin-Exposition über den Cut-Off, Mitomycin C hatte aber stets den stärkeren Effekt. Die höchsten Stx2e-Titer wurden bei 50 % (Mitomycin C) bzw. 200 % der MHK (Enrofloxacin) erreicht. Während Mitomycin C bereits nach dreistündiger Exposition in jeder der gewählten Wirkstoffkonzentrationen zu einem Anstieg des Stx2e-Titers über den Cut-Off führte, wurde dies im Fall von Enrofloxacin nur bei Einsatz der Höchstdosis (200 % der MHK) beobachtet (**Abbildung 20**). Bei den Feldstämmen 1485/03 und 2316/04-2 bewirkte keiner der beiden Wirkstoffe einen Anstieg der Stx2e-Konzentration über den Cut-Off.



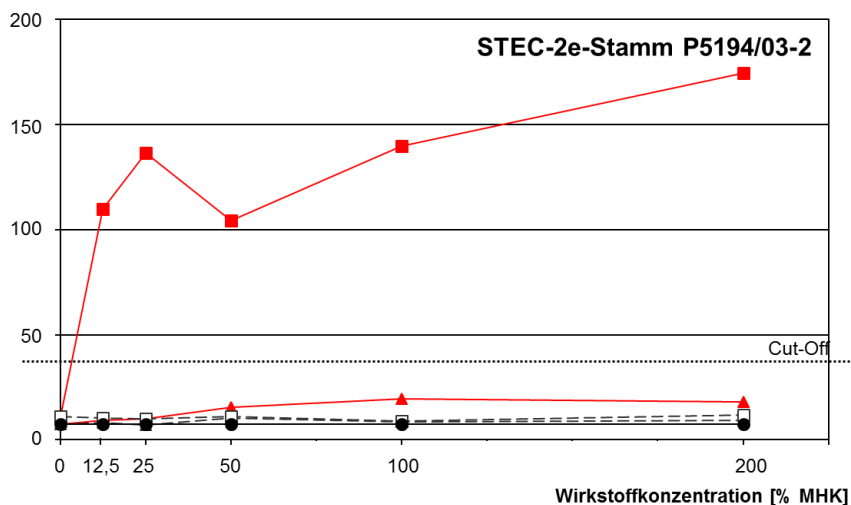
**Abbildung 18:** nlog-Stx2a- bzw. nlog-Stx2e-Titer (Toxintiter) in Kulturüberständen der *E. coli*-Stämme EDL 933 und 2771/97 in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Mitomycin C (MMC) und Enrofloxacin (ENR). (Stx2e-ELISA-Ergebnisse)

- Toxintiter vor Zugabe eines Wirkstoffs
- ▲ bzw. ■ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit MMC
- △ bzw. □ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit ENR
- ..... Cut-Off des Stx2e-ELISA: 44,7 OD %

nlog-Stx2e-Titer [OD %]



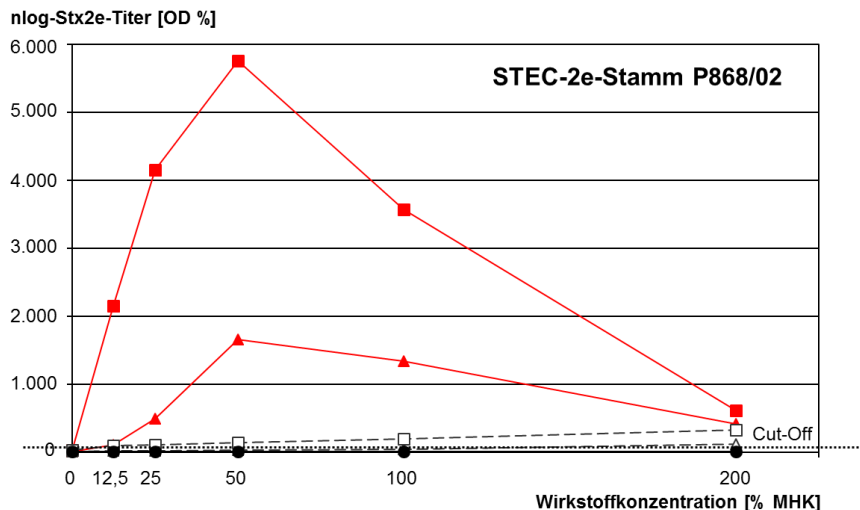
nlog-Stx2e-Titer [OD %]



**Abbildung 19:** nlog-Stx2e-Titer (Toxintiter) in Kulturüberständen der STEC-2e-Stämme 299 und P5194/03-2 in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Mitomycin C (MMC) und Enrofloxacin (ENR). (Stx2e-ELISA-Ergebnisse)

- Toxintiter vor Zugabe eines Wirkstoffs
- ▲ bzw. ■ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit MMC
- ▴ bzw. ▢ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit ENR
- ..... Cut-Off des Stx2e-ELISA: 44,7 OD %

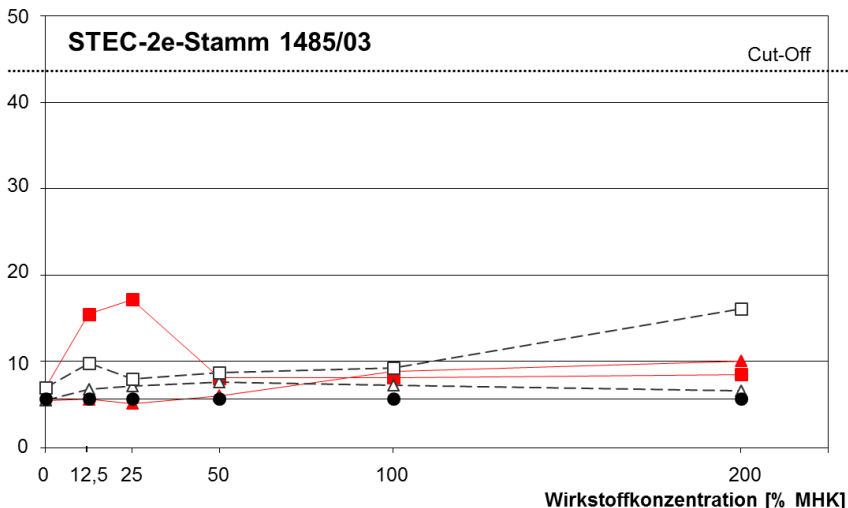




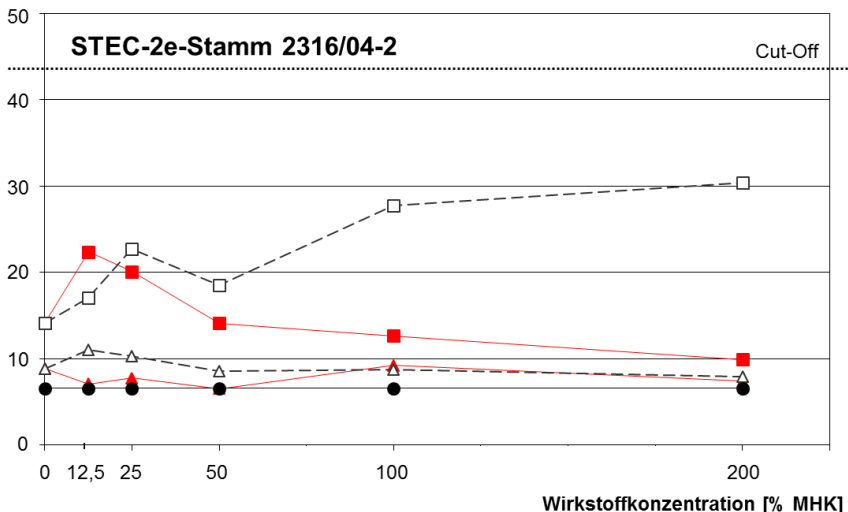
**Abbildung 20:** nlog-Stx2e-Titer (Toxintiter) im Kulturüberstand des STEC-2e-Stammes P868/02 in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen Mitomycin C (MMC) und Enrofloxacin (ENR). (Stx2e-ELISA-Ergebnisse)

- Toxintiter vor Zugabe eines Wirkstoffs
- ▲ bzw. ■ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit MMC
- △ bzw. □ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit ENR
- ..... Cut-Off des Stx2e-ELISA: 44,7 OD %

nlog-Stx2e-Titer [OD %]



nlog-Stx2e-Titer [OD %]



**Abbildung 21:** nlog-Stx2e-Titer in Kulturüberständen der STEC-2e-Stämme 1485/03 und 2316/04-2 in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen Mitomycin C (MMC) und Enrofloxacin (ENR). (Stx2e-ELISA-Ergebnisse)

- Toxintiter vor Zugabe eines Wirkstoffs
- ▲ bzw. ■ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit MMC
- △ bzw. □ Toxintiter nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation mit ENR
- ..... Cut-Off des Stx2e-ELISA: 44,7 OD %

### **Antinfektivwirkung auf die Stx2e-Bildung/-Freisetzung der 30 ausgewählten STEC-2e-Feldstämme**

Aufgrund der oben beschriebenen Resultate wurde die Wirkung der Antinfektiva Amoxicillin, Colistin, Enrofloxacin, Erythromycin, Neomycin oder Tetrazyklin dann bei einer Konzentration von 100 % der jeweiligen MHK sowie einer 5-stündigen Einwirkzeit geprüft.

Bei 15 der 30 untersuchten STEC-2e-Feldstämme (50 %) induzierte wenigstens eines dieser Antinfektiva einen Anstieg der im Kulturüberstand nachweisbaren Stx2e-Konzentration. Bei 7 von diesen 15 Feldstämmen (insgesamt 23,3 %) lag der  $\log$ -Stx2e-Titer sogar über dem Cut-Off des Stx2e-ELISA, weshalb diese Stämme als „stimulierbar“ durch das jeweilige Antinfektivum klassifiziert wurden.

Von den 7 stimulierbaren Stämmen reagierten sechs Stämme auf Enrofloxacin (P868/02, 2316/04-2, 4946/00, P8615/00-1, P4663/02 und 3465/04-2), zwei auf Neomycin (P868/02 und P2164/01-3) und ein Stamm auf Amoxicillin (2316/04-2). Dabei wurde die Stx2e-Bildung und/oder -Freisetzung bei fünf Stämmen entweder nur durch Enrofloxacin (4946/00, P8615/00-1, P4663/02 und 3465/04-2) oder Neomycin (P2164/01-3) stimuliert, während sie bei zwei Stämmen (P868/02 und 2316/04-2) durch zwei Antinfektiva gefördert wurde (Enrofloxacin und Neomycin bei Stamm P868/02; Enrofloxacin und Amoxicillin bei Stamm 2316/04-2). Bei zwei (28,6 %) der mit einem Antinfektivum stimulierbaren Feldstämme war ein Anstieg der Stx2e-Konzentration auch mit Mitomycin C und/oder UV-Licht stimuliert worden (P868/02 und 4946/00). Aber auch 4 von 23 Stämmen (17,4 %), die sich mit Antinfektiva nicht stimulieren ließen, hatten mit vermehrter Stx2e-Freisetzung auf die Einwirkung von Mitomycin C (Stamm 299), UV-Licht (P5413/04-1) oder beide Faktoren (P5196/03-2 und P5194/03-2) reagiert. Auf Antinfektiva reagierten die beiden Feldstämme P8615/00-1 (16,9-fach, Enrofloxacin) und P4663/02 (10,5-fach, Enrofloxacin) am stärksten. Höhere Werte waren bei STEC-2e-Feldstämmen nur nach Stimulation mit Mitomycin C und/oder UV-Licht nachweisbar (P868/02 sowie P5413/04-1).

Von den getesteten Antinfektiva hatten Erythromycin und Tetrazyklin unter den gewählten Bedingungen fast ausnahmslos keine stimulierende Wirkung auf die STEC-2e-Feldstämme. Vielmehr war die Stx2e-Konzentration nach Einwirkung von Erythromycin genauso groß (7 Stämme) oder sogar geringer (22 Stämme) als ohne Behandlung. Bei Verwendung von Tetrazyklin traf dies auf 4 bzw. 26 Stämme zu. Unter dem Einfluss von Tetrazyklin ließ sich die Stx2e-Bildung bzw. -Freisetzung signifikant weniger stimulieren als nach einer Behandlung mit den anderen 7 exogenen Faktoren (einfaktorielle ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test,  $p < 0,05$ ). Dagegen konnte nach einer Behandlung mit Enrofloxacin die Stx2e-Bildung bzw. -Freisetzung der 30 Stämme am stärksten gesteigert werden. Die

Stimulierbarkeit nach der Behandlung mit Enrofloxacin war signifikant stärker als nach der Behandlung mit Tetrazyklin, Erythromycin oder einer UV-Bestrahlung (einfaktorielle ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test,  $p < 0,01$ ).

Die Stx2e-Bildung bzw. -Freisetzung konnte bei STEC-2e-Stämmen, die als EDEC klassifiziert worden waren, signifikant häufiger (Chi-Quadrat-Test,  $p < 0,05$ , siehe **Tabelle 23**) mit Antiinfektiva und/oder Mitomycin C und/oder UV-Licht stimuliert werden als bei Stämmen mit der Klassifikation EDEC/ETEC oder sonstige STEC-2e.

Drei der sieben Stämme (P868/02, 2316/04-2, 4946/00), die mit einem Antiinfektivum stimulierbar waren, waren als typische Ödemkrankheitserreger, EDEC (*stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>*, *fedA<sup>+</sup>*), eingestuft, drei weitere Stämme (P2164/01-4, P8615/00-1, P4663/02) kodierten zusätzlich zu Stx2e und F18-Fimbrien für wenigstens ein *E. coli*-Enterotoxin. Ein stimulierbarer Stamm (3465/04-2) besaß von den geprüften Virulenzgenen nur das *stx<sub>2e</sub>*-Gen. Die Beschränkung stimulierbarer Stämme auf das Pathovar EDEC, wie sie nach Exposition gegenüber Mitomycin C und UV-Licht beobachtet werden konnte (alle 6 Stämme, die im Sinne einer Stimulation reagierten), war bei der Reaktion auf Antiinfektiva nicht vorhanden.

Betrachtete man die gemittelten Stx2e-Konzentrationen der drei verschiedenen Pathovare (**Abbildung 22**), so fiel auf, dass die Konzentration bei den EDEC-Stämmen nach der Exposition gegenüber Antiinfektiva (außer Erythromycin und Tetrazyklin), Mitomycin C und UV-Licht größer war als in den unbehandelten Vergleichskulturen. Diese Zunahme von Stx2e war jedoch nur bei Amoxicillin ( $p < 0,05$ ) signifikant. Bei den EDEC/ETEC-Stämmen war die gemittelte Stx2e-Konzentration nur nach Neomycin- bzw. Enrofloxacin-Zugabe höher als in der unbehandelten Kultur, allerdings nicht signifikant höher ( $p > 0,05$ ). Bei den sonstigen STEC-2e-Stämmen lag die gemittelte Stx2e-Konzentration nach Exposition gegenüber einem Antiinfektivum, MMC oder UV-Licht stets niedriger als nach Standardanzucht. Außer bei Neomycin waren diese Unterschiede signifikant ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 22: Veränderung der Stx2e-Konzentration in Kulturüberständen der 30 getesteten STEC-2e-Feldstämme und *E. coli*-Kontrollstämmen bei Anzucht unter dem Einfluss von Antiinfektiva (100 % MHK), Mitomycin C (0,5 µg/ml) oder UV-Licht (312 nm, 30 s) (Verhältnisse der nlog-Stx2e-Titer aus dem Stx2e-ELISA mit/ohne Behandlung)**

Pathovar	Stamm	n-fache Stx2e-Konzentration unter dem Einfluss von							
		AMX	COL	ENR	EM	NEO	TC	MMC	UV
EDEC	P5196/03-2	1,0	0,9	1,2	1,0	3,5	0,8	3,0	11,7
	P5194/03-2	1,2	0,9	1,1	0,9	2,6	0,9	7,1	7,8
	299	1,1	1,2	1,5	1,0	0,9	0,6	7,8	1,4
	82/02	0,9	1,2	0,9	0,6	1,0	0,7	0,7	0,3
	P868/02	1,2	1,3	3,1	0,9	9,1	0,3	47,3	50,8
	2947/02-2	1,0	1,0	1,1	0,3	0,7	0,3	0,8	0,7
	2316/04-2	3,2	1,3	5,1	0,9	0,9	0,6	1,2	0,4
	4946/00	1,0	0,9	2,0	0,8	1,3	0,9	1,2	0,9
	3379/02	1,3	1,2	1,2	0,6	1,0	0,7	0,5	0,5
	P5413/04-1	1,1	1,0	0,8	0,7	0,8	0,3	1,3	43,6
EDEC/ETEC	P2164/01-3	0,7	0,3	0,8	0,6	1,2	0,4	0,2	0,0
	P283/01	0,9	0,4	1,1	0,7	1,0	0,1	0,6	0,0
	P3450/02-1	0,8	0,5	0,7	0,6	0,9	0,1	0,4	0,0
	P8106/01-3	1,0	0,7	0,8	0,4	1,6	0,3	0,6	0,2
	E57	0,5	0,9	0,9	0,4	0,8	0,4	1,0	0,8
	P8615/00-1	0,4	0,9	16,9	0,3	0,6	0,2	0,2	0,2
	42/02	0,8	0,4	0,3	0,4	0,9	0,2	0,6	0,8
	P4663/02	0,4	0,9	10,5	0,1	1,0	0,1	0,2	0,3
	P106/03-1	1,2	0,6	0,6	0,3	0,9	0,3	0,5	0,5
	1485/03	0,6	0,9	1,1	0,9	1,1	0,4	1,0	1,1
	P4470/03-1	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	0,7	0,7	1,3
Sonstige STEC-2e	1912/04	0,9	0,6	0,5	0,3	1,1	0,1	0,3	0,2
	3465/04-2	0,1	0,1	1,4	0,1	0,9	0,0	0,1	0,2
	P9116/00-7	0,8	0,7	0,8	0,5	0,1	0,9	0,4	0,1
	P5546/05-1	0,5	0,7	0,5	0,6	0,8	0,1	0,2	0,1
	1735/03-1	1,0	1,0	0,7	0,5	1,0	0,3	0,4	0,4
	P1921/02-3	0,7	0,6	0,8	0,3	1,0	0,1	0,7	0,1
	1694/03-1	0,8	1,0	0,8	1,5	1,1	0,9	0,9	0,1
	P3753/01-4	0,6	0,9	0,6	0,4	1,0	0,1	0,4	0,0
	P8172/00-3	0,4	0,8	0,6	0,8	0,6	0,1	0,5	0,4
Kontrollstämmen	EDL 933	0,5	0,6	6,6	0,4	1,0	0,0	102,7	114,4
	2771/97	0,4	0,5	3,6	0,2	1,0	0,0	231,7	103,2
	987P	0,8	0,8	0,9	0,9	0,5	1,0	0,6	0,6
	B41	0,6	0,4	1,0	1,9	0,8	0,7	0,4	0,3

**Erläuterungen:** AMX Amoxicillin; COL Colistin; EM Erythromycin; ENR Enrofloxacin; MMC Mitomycin C; NEO Neomycin; TC Tetrazyklin; UV UV-Licht; Begriffe EDEC, EDEC/ETEC und sonstige STEC-2e siehe Tabelle 12

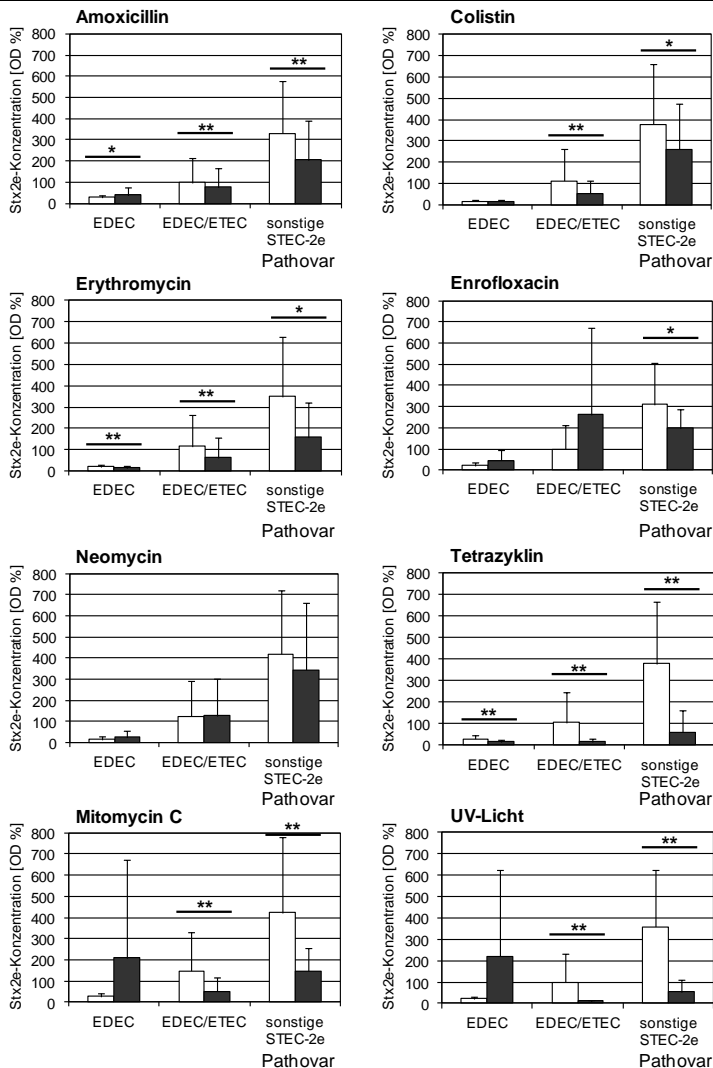
- Rot** Die Stx2e-Konzentration im Überstand der behandelten Kultur beträgt mehr als 110 % der Konzentration im Überstand der nicht behandelten Kultur bei gleichzeitigem Anstieg der Stx2e-Konzentration über den Stx2e-ELISA-Cut-Off.
- Orange** Die Stx2e-Konzentration im Überstand der behandelten Kultur beträgt mehr als 110 % der Konzentration im Überstand der nicht behandelten Kultur, jedoch ohne Anstieg der Stx2e-Konzentration über den Stx2e-ELISA-Cut-Off.
- Hellgrün** Die Stx2e-Konzentration im Überstand der behandelten Kultur beträgt 90 - 110 % der Stx2e-Konzentration im Überstand der nicht behandelten Kultur.
- Dunkelgrün** Die Stx2e-Konzentration im Überstand der behandelten Kultur beträgt weniger als 90 % der Stx2e-Konzentration im Überstand der nicht behandelten Kultur.

**Tabelle 23:** Stimulierbarkeit von STEC-2e-Feldstämmen zur Freisetzung von Stx2e in Abhängigkeit von der Pathovar-Klassifikation (Ergebnisse im Stx2e-ELISA)

Pathovar	Anzahl der Stämme				
	getestet	stimulierbar			gesamt
		nur durch AI	nur durch MMC u./o. UV	sowohl durch AI als auch durch MMC u./o. UV	
EDEC	10	1	4	2	7 (70,0 %)*
EDEC/ETEC	11	3	0	0	3 (27,3 %)*
Sonstige STEC-2e	9	1	0	0	1 (11,1 %)*
<b>Summe</b>	30	5	4	2	11 (36,7 %)

**Erläuterungen:** AI Antiinfektivum; MMC Mitomycin C; u./o. und/oder; UV Bestrahlung mit UV-Licht

\* Die Untersuchung mit dem Chi-Quadrat-Test ergab signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der Stimulierbarkeit von Stämmen verschiedener Pathovare ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 22: Stx2e-Konzentration in Kulturüberständen von STEC-2e-Feldstämmen ohne und mit Behandlung mit Antiinfektiva, MMC oder UV-Licht in Abhängigkeit von der Pathovarklassifikation**

Stx2e-ELISA-Ergebnisse, arithmetische Mittelwerte der nlog-Stx2e-Titer mit  $n = 10$  (EDEC),  $n = 11$  (EDEC/ETEC) bzw.  $n = 9$  Messwerten (sonstige STEC-2e); EDEC, EDEC/ETEC, sonstige STEC-2e siehe Tabelle 12.

UV-Licht Bestrahlung bei 312 nm für 30 s, □ ohne Behandlung, ■ mit Behandlung. Signifikante Unterschiede sind durch \* ( $p < 0,05$ ) bzw. \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

### Reproduzierbarkeit der Antiinfektivawirkung auf die Stx2e-Bildung

Die Untersuchung hatte ergeben, dass die STEC-Stämme mit ihrer Stx2e-Bildung und -Freisetzung sehr verschieden auf die Einwirkung von Antiinfektiva reagierten. Um festzustellen, wie stark der gemessene Stx2e-Titer von Untersuchung zu Untersuchung schwankte, wurde dieser bei drei ausgewählten porcinen STEC-2e-Feldstämmen sowie bei dem humanen STEC-2e-Stamm 2771/97 und dem *stx<sub>2e</sub>*-negativen Kontrollstamm 987P an fünf verschiedenen Tagen in identischer Weise ermittelt. Dazu wurden die Stämme an jedem Versuchstag in identischer Weise für jeweils 5 Stunden mit und ohne Einwirkung von Enrofloxacin inkubiert. Die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand wurde danach mit dem Stx2e-ELISA gemessen. Die STEC-2e-Feldstämmen waren so ausgewählt worden, dass je ein Stamm vertreten war, bei dem die Einwirkung von Enrofloxacin in den Versuchen zuvor zu einem Anstieg oder zu einer Abnahme oder zu keiner Änderung der Stx2e-Konzentrationen geführt hatte. Aus den für die identischen Inkubationsbedingungen eines Stammes erzielten nlog-Stx2e-Titern ( $n = 5$ ) wurden die arithmetischen Mittelwerte, Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten (VK) berechnet (siehe **Tabelle 24**).

Die Messergebnisse waren für die beiden Feldstämmen P868/02 und 1912/04 sowie den Kontrollstamm 987P unter dem Einfluss von Enrofloxacin gut reproduzierbar, da die Variationskoeffizienten (VK) maximal 12,3 % betrugen. Dagegen differierten die am ersten Tag für den Stamm P283/01 ermittelten Stx2e-Titer stark von denjenigen der anderen vier Versuchstage, weshalb der VK bei diesem Stamm mit 39,2 % einen hohen Wert annahm. Die Stx2e-Titer des Positivkontrollstammes 2771/97 unterlagen weniger starken Schwankungen (VK 24,9 %).



**Tabelle 24:** Ergebnisse der an 5 verschiedenen Tagen wiederholten Bestimmung der Stx2e-Konzentration in den Kulturüberständen von STEC-2e-Feldstämmen sowie den *E. coli*-Stämmen 2771/97 und 987P (Ergebnisse im Stx2e-ELISA)

Stamm mit Inkubations- bedingungen	nlog-Stx2e-Titer [OD %]					MW	SD	VK [%]
	am Versuchstag Nr.							
	1	2	3	4	5			
P868/02 0 h	16	15	17	15	17	16	1,1	6,9
P868/02 5 h ohne ENR	21	41	44	42	47	39	10,1	25,9
P868/02 5 h mit ENR	103	121	134	129	144	126	15,5	12,3
1912/04 0 h	30	26	27	23	20	25	4,0	15,9
1912/04 5 h ohne ENR	643	558	581	573	572	585	33,4	5,7
1912/04 5 h mit ENR	435	392	396	422	412	411	17,7	4,3
P283/01 0 h	22	23	25	23	24	23	1,0	4,3
P283/01 5 h ohne ENR	25	865	791	265	388	467	355,5	76,2
P283/01 5 h mit ENR	94	384	317	290	296	276	108,4	39,2
2771/97 0 h	18	16	18	21	19	19	1,9	10,2
2771/97 5 h ohne ENR	1.937	1.556	1.173	1.489	1.090	1.449	337,6	23,3
2771/97 5 h mit ENR	7.281	7.797	3.972	7.700	5.832	6.516	1.625,5	24,9
987P 0 h	15	14	16	15	14	15	0,9	6,0
987P 5 h ohne ENR	17	16	18	15	15	16	1,4	8,8
987P 5 h mit ENR	13	15	15	15	15	15	0,8	5,5

**Erläuterungen:** **ENR** Enrofloxacin; **MW** arithmetischer Mittelwert (n = 5 Messungen);  
**SD** Standardabweichung; **VK** Variationskoeffizient (SD/MW x 100)

#### 4.5 Vorkommen von induzierbaren, lytischen Bakteriophagen bei porcinen STEC-2e-Feldstämmen

Jeder der 30 ausgewählten STEC-2e-Stämme wurde mit Norfloxacin und mit demjenigen Faktor (ein Antiinfektivum, Mitomycin C oder UV-Licht) behandelt, der in den oben beschriebenen Versuchen auf die Stx2e-Freisetzung (nlog-Stx2e-Titer im Kulturüberstand) jeweils am stärksten stimulierend gewirkt hatte („optimaler exogener Faktor“). Die experimentelle Vorgehensweise erfolgte in Analogie zu den Versuchen zuvor. Bakteriolytische Effekte wurden durch die photometrische Bestimmung der OD<sub>600</sub> der Kulturen erfasst. Nach der Anzucht wurden die Kulturüberstände mittels Plaquetest auf eine Plaque-erzeugende Aktivität (Hinweis auf induzierbare, lytische Bakteriophagen) untersucht. War eine solche Aktivität nachweisbar, wurden einzelne Plaques mittels Multiplex-PCR auf *stx*<sub>2e</sub>-spezifische DNS untersucht. In einem zweiten Schritt wurde mit dem *stx*<sub>2e</sub>-Phagentest geprüft, ob die 30 Stämme *stx*<sub>2e</sub>-konvertierende Bakteriophagen beherbergen.

##### 4.5.1 Bakteriolytische Effekte unter dem Einfluss von Norfloxacin, anderen Antiinfektiva, Mitomycin C oder UV-Licht

Von jedem auf bakteriolytische Effekte zu prüfenden Stamm wurden parallel drei Schüttelkulturen hergestellt: Eine mit Norfloxacin (f. c. 0,5 µg/ml) behandelte Kultur, eine Kultur, die mit dem optimalen exogenen Faktor behandelt worden war und eine nicht behandelte Kultur. Nach der Bebrütung (aerob, 180 rpm, 37°C, 4 h) wurde die OD<sub>600</sub> jeder Kultur gemessen. OD<sub>600</sub>-Werte, die während der Einwirkung von Norfloxacin bzw. des anderen exogenen Faktors unter den Wert vor Beginn der Behandlung sanken, wurden als Anzeichen einer Bakterienzellyse interpretiert.

Bei 13 von 30 Stämmen (43,3 %) trat unter der Behandlung mit Norfloxacin das gesuchte Zeichen der Bakterienzellyse auf. Dies traf auf 3 der 10 EDEC-Stämme (30 %), 6 der 11 EDEC/ETEC-Stämme (54,5 %) und 4 der 9 sonstigen STEC-2e-Stämme (44,4 %) zu. Dagegen verursachte die Behandlung mit dem jeweils optimalen exogenen Faktor eine Bakterienzellyse nur bei dem EDEC-Stamm P868/02 (hier: Behandlung mit Mitomycin C). Stämme, die unter dem Einfluss von Norfloxacin lysiert wurden, unterschieden sich hinsichtlich der Stx2e-Konzentration, welche in den vorangegangenen Versuchen in deren Kulturüberständen gemessen worden war, nicht signifikant von Stämmen ohne Bakterienzellyse ( $p = 0,747$  im t-Test bzw.  $p = 0,738$  im Mann-Whitney-U-Test). Dabei wurde die jeweils höchste Stx2e-Konzentration berücksichtigt (nlog-Stx2e-Titer), welche nach Behandlung mit einem der Antiinfektiva, MMC oder UV-Licht gemessen worden war. Der Zusammenhang zwischen der Bakterienzellyse und der Pathovar-Klassifikation bzw. dem O-Typ der STEC-2e-Stämme konnte wegen der geringen Anzahl an Stämmen nicht auf Signifikanz geprüft werden.

**Tabelle 25: Bakteriolytische Effekte in Kulturen von STEC-2e-Stämmen unter dem Einfluss von Norfloxacin bzw. dem optimalen exogenen Faktor**

Pathovar	Stamm	Bakteriolytische Effekte			
		Norfloxacin	Optimaler exogener Faktor		
		Änderung der Kulturdichte [ $\Delta OD_{600}$ ]	Faktor	Dosis	Änderung der Kulturdichte [ $\Delta OD_{600}$ ]
<b>EDEC</b>	P5196/03-2	<b>-0,023</b>	UV	312 nm 30 s	0,434
	P5194/03-2	0,157	MMC	0,5 µg/ml	0,713
	299	<b>-0,079</b>	MMC	0,5 µg/ml	1,032
	82/02	<b>-0,047</b>	TC	64 µg/ml	0,734
	P868/02	0,096	MMC	0,5 µg/ml	<b>-0,319</b>
	2947/02-2	0,083	AMX	256 µg/ml	1,589
	2316/04-2	1,507	ENR	0,008 µg/ml	2,073
	4946/00	1,704	ENR	0,008 µg/ml	2,450
	3379/02	0,040	AMX	2 µg/ml	1,702
	P5413/04-1	0,154	UV	312 nm 30 s	1,587
<b>EDEC/ETEC</b>	P2164/01-3	0,015	NEO	64 µg/ml	2,085
	P283/01	<b>-0,029</b>	NEO	64 µg/ml	1,933
	P3450/02-1	0,111	NEO	1 µg/ml	1,586
	P8106/01-3	0,017	AMX	256 µg/ml	2,118
	E57	<b>-0,029</b>	MMC	0,5 µg/ml	0,244
	P8615/00-1	<b>-0,009</b>	ENR	0,015 µg/ml	1,882
	42/02	<b>-0,008</b>	AMX	256 µg/ml	1,752
	P4663/02	<b>-0,021</b>	ENR	0,015 µg/ml	1,635
	P106/03-1	0,015	AMX	256 µg/ml	1,625
	1485/03	<b>-0,025</b>	ENR*	1 µg/ml	0,264
	P4470/03-1	0,024	AMX	2 µg/ml	1,690
<b>Sonstige STEC-2e</b>	1912/04	0,062	NEO	2 µg/ml	2,530
	3465/04-2	<b>-0,003</b>	ENR	0,015 µg/ml	2,057
	P9116/00-7	<b>-0,009</b>	TC	0,5 µg/ml	1,530
	P5546/05-1	<b>-0,001</b>	NEO	64 µg/ml	3,197
	1735/03-1	<b>-0,094</b>	AMX	4 µg/ml	1,204
	P1921/02-3	0,008	NEO	2 µg/ml	2,382
	1694/03-1	0,075	ENR	0,015 µg/ml	2,501
	P3753/01-4	0,015	NEO	1 µg/ml	2,536
	P8172/00-3	0,012	COL	2 µg/ml	2,124
<b>Kontroll- stamm</b>	2771/97	<b>-0,024</b> bis +0,999	nicht durchgeführt		

**Erläuterungen:** **AMX** Amoxicillin; **COL** Colistin; **ENR** Enrofloxacin; **MMC** Mitomycin C; **NEO** Neomycin; **TC** Tetrazyklin; **UV** UV-Bestrahlung. Die Inkubation mit den genannten Faktoren erfolgte für 4 h außer bei \* (30 min).

$\Delta OD_{600}$  = ( $OD_{600}$  nach 4-stündiger Inkubation) - ( $OD_{600}$  bei Inkubationsbeginn)

Bei  $\Delta OD_{600} < 0$  liegt eine Bakterienzelllyse vor.

#### 4.5.2 Plaque-erzeugende Aktivität nach Behandlung der STEC-2e-Feldstämme mit Norfloxacin, anderen Antiinfektiva, Mitomycin C oder UV-Licht

Nach der Behandlung der 30 STEC-2e-Feldstämme mit Norfloxacin und dem jeweils optimalen exogenen Faktor wurden die filtrierten Kulturüberstände dem Plaquetest unterzogen. Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  diente dabei als Empfängerstamm für die möglicherweise induzierten Bakteriophagen. Die Resultate dieser Versuche sind in der **Tabelle 30** zusammengefasst.

Der Kulturüberstand des mit Norfloxacin behandelten Kontrollstammes *E. coli* 2771/97, der an jedem Versuchstag mitgeführt wurde, besaß stets eine mit dem Empfängerstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  nachweisbare Plaque-erzeugende Aktivität. Eine derartige Aktivität war aber auch in den Kulturüberständen von 12 der 30 STEC-2e-Stämme (40 %) nachweisbar. Diese trat dabei immer sowohl bei der Norfloxacin-Exposition als auch nach der Behandlung mit dem jeweils optimalen exogenen Faktor auf. Der Plaquetiter (Plaque-bildende Einheiten pro Milliliter Kulturüberstand, PbE/ml) nahm Werte zwischen 10 und 9.500 PbE/ml (Norfloxacin) bzw. zwischen 860 und 121.200 PbE/ml (optimaler exogener Faktor) an. Dabei induzierten die jeweils optimalen exogenen Faktoren im Mittel signifikant höhere Plaquetiter als Norfloxacin ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney-U-Test). Bis auf drei Stämme sahen die Norfloxacin-assoziierten Plaques und die mit dem optimalen Faktor assoziierten Plaques eines Stammes morphologisch gleich aus. Die Kulturüberstände des Stammes 4946/00 erzeugten auf dem *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Zellrasen ein Gemisch aus klaren und trüben Plaques (Norfloxacin) bzw. homogen klare Plaques (Enrofloxacin).

Nach der Behandlung von 5 Stämmen mit den Antiinfektiva Tetrazyklin (Stamm 82/02), Enrofloxacin (Stamm 1485/03) bzw. Neomycin (Stämme P2164/01-3, P283/01 und P5546/05-1) sowie nach der Behandlung der beiden Stämme P5196/03-2 bzw. P5194/03-2 mit UV-Licht bzw. mit Mitomycin C wiesen ihre Kulturüberstände eine Aktivität auf, die im Plaquetest zur vollständigen Auflösung des *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Zellrasens führte. Einzelne Plaques waren nicht zu erkennen. Diesen Effekt hatte Norfloxacin bei keinem einzigen Stamm. In den Kulturüberständen der beiden behandelten Stämme 82/02 (Tetrazyklin) und 1485/03 (Enrofloxacin) ließ sich Plaque-erzeugende Aktivität nachweisen und quantifizieren, jedoch durften hierzu nur geringere Mengen der Kulturüberstände (10, 50 und 100  $\mu$ l anstelle von 400 und 800  $\mu$ l) im Plaquetest eingesetzt werden. Bei den 3 Stämmen, die mit Neomycin behandelt worden waren, war die Zerstörung des Zellrasens beim Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  auch dann zu beobachten, wenn Neomycin in der fraglichen Endkonzentration (f. c. 64  $\mu$ g/ml, vorverdünnt in LB-Medium) alleine im Plaquetest verwendet wurde. Bei den beiden Stämmen P5196/03-2 und P5194/03-2 war der lytische Effekt des Kulturüberstands auch durch Reduktion des im Plaquetest verwendeten Volumens auf 10  $\mu$ l nicht auszuverdünnen. Die verschiedenen

Erscheinungsbilder der Plaques sowie das Aussehen des lytischen Effekts bei den Stämmen P5196/03-2 und P5194/03-2 sind in der **Abbildung 23** dargestellt.

Plaque-erzeugende Aktivität trat bei 3 (30 %) der 10 EDEC-, 6 (54,5 %) der 11 EDEC/ETEC- und bei 3 (30 %) der 9 sonstigen STEC-2e-Stämme auf. Das Phänomen war mit der Pathovar-Klassifikation demnach nicht signifikant assoziiert ( $p = 0,460$ , Chi-Quadrat-Test).

Von den 30 ausgewählten Stämmen gehörten 5 Stück dem O-Typ O138 an, 5 Stämme besaßen den O-Typ O139, 10 Stämme den O-Typ O141 und 4 Stämme den O-Typ O147. Bei 6 Stämmen war der O-Typ mit den gewählten Antiseren nicht typisierbar. Von den insgesamt 12 Stämmen, bei denen eine Plaque-erzeugende Aktivität nachgewiesen worden war, gehörten 8 Stämme dem O-Typ O141 an. Diese Häufung war signifikant ( $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

Bezogen auf alle 30 getesteten Stämme bestand kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Plaque-erzeugenden Aktivität nach einer Behandlung und einer messbaren Bakterienzelllyse in der Kultur (**Tabelle 26**). Dies war unabhängig davon, ob die Bakterienzelllyse durch Behandlung mit Norfloxacin ( $p = 0,547$ , Chi-Quadrat-Test) oder dem optimalen exogenen Faktor ( $p = 1,000$ , Exakter Test nach Fisher) ausgelöst worden war. Es bestand auch kein Zusammenhang zwischen der mittleren Stimulierbarkeit der Stx2e-Freisetzung (n-fach) und dem Auftreten einer Plaque-erzeugenden Aktivität (**Tabelle 27**,  $p = 0,942$ , t-Test bzw.  $p = 0,716$ , Mann-Whitney-U-Test). Die mittlere Stx2e-Konzentration in den Kulturüberständen von Stämmen mit oder ohne Plaque-erzeugende Aktivität unterschied sich ebenfalls nicht signifikant (**Tabelle 28**,  $p = 0,331$ , t-Test bzw.  $p = 0,128$ , Mann-Whitney-U-Test).

**Tabelle 26:** Zusammenhang zwischen der Plaque-erzeugenden Aktivität und der Bakterienzelllyse in Abhängigkeit von verschiedenen Behandlungen

Plaque-erzeugende Aktivität nach Einwirkung	Anzahl der Stämme	
	mit Bakterienzelllyse	ohne Bakterienzelllyse
<b>von Norfloxacin</b>		
ja	6	6
nein	7	11
<b>des jeweils optimalen exogenen Faktors</b>		
ja	0	12
nein	1	17

**Tabelle 27:** Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Plaque-erzeugenden Aktivität und einem zuvor beobachteten Anstieg der Stx2e-Konzentration

Plaque-erzeugende Aktivität	n-fache Zunahme der Stx2e-Konzentration		Anzahl der Stämme
	MW	SD	
ja	6,0	12,7	12
nein	5,6	11,0	18

**Erläuterungen:** MW arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung

**Tabelle 28:** Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Plaque-erzeugenden Aktivität und der Höhe der zuvor unter Einwirkung des optimalen exogenen Faktors gemessenen Stx2e-Konzentration

Plaque-erzeugende Aktivität	Stx2e-Konzentration (nlog-Stx2e-Titer [OD %])		Anzahl der Stämme
	MW	SD	
ja	255,2	333,4	12
nein	398,0	418,0	18

**Erläuterungen:** MW arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung

Ferner wurde geprüft, ob ein positives Ergebnis im Plaquetest mit der zuvor nach einer Behandlung mit Norfloxacin bzw. mit dem optimalen exogenen Faktor gemessenen Stx2e-Konzentration in den Kulturüberständen solcher Stämme korrelierte. Allerdings wurde die Wirkung von Norfloxacin in den im **Kapitel 4.4.2.3** beschriebenen Untersuchungen nicht bestimmt, weshalb für diesen Wirkstoff keine Messwerte der Stx2e-Konzentration vorlagen. Deshalb wurden für die statistische Analyse diejenigen Stx2e-Konzentrationen herangezogen, die nach der Einwirkung von Enrofloxacin in den Kulturüberständen gemessen worden waren. Die Ergebnisse dieser Datenanalyse sind in der **Tabelle 29** zusammengefasst.

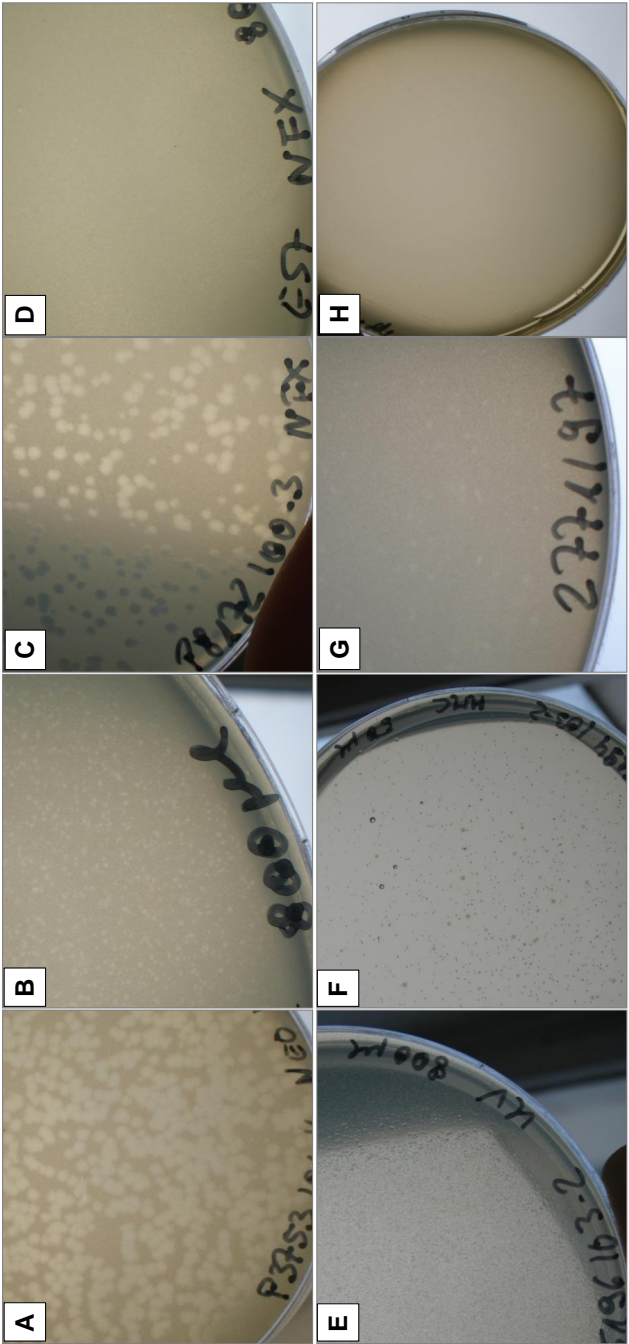
Im Mittel waren die Stx2e-Konzentrationen, die unter dem Einfluss von Enrofloxacin bzw. unter dem Einfluss des optimalen exogenen Faktors erzeugt wurden, bei Stämmen mit Plaque-erzeugender Aktivität niedriger als bei Stämmen ohne Plaque-erzeugende Aktivität. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,744$  für Enrofloxacin bzw.  $p = 0,331$  für den optimalen exogenen Faktor, t-Test). Die Stx2e-Konzentrationen, welche nach einer Behandlung mit dem optimalen exogenen Faktor gemessen worden war, waren im Mittel stets höher als die gemittelten Stx2e-Konzentrationen nach einer Behandlung mit Enrofloxacin. Dabei unterschied sich die Stx2e-Konzentration nach der Behandlung mit dem optimalen exogenen Faktor bei den Stämmen ohne Plaque-erzeugende Aktivität signifikant von der Stx2e-Konzentration der Stämme nach einer Behandlung mit Enrofloxacin, unab-

hängig davon, ob eine Plaque-erzeugende Aktivität auftrat ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney-U-Test) oder nicht ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test).

**Tabelle 29:**      **Stx2e-Konzentrationen in Kulturüberständen von STEC-2e-Feldstämmen in Abhängigkeit von der Plaque-erzeugenden Aktivität dieser Stämme** (Ergebnisse aus dem Stx2e-ELISA und dem Plaquetest)

Plaque- erzeugende Aktivität	Anzahl der Stämme	Stx2e-Konzentration [OD %] unter dem Einfluss von			
		Enrofloxacin		Optimaler exogener Faktor	
		MW	SD	MW	SD
nein	18	184,1 <sup>a</sup>	262,8	398,0 <sup>ab</sup>	418,0
ja	12	150,9 <sup>b</sup>	279,1	255,2	333,4

**Erläuterungen:** **MW** arithmetischer Mittelwert; **SD** Standardabweichung. Mittelwerte mit identischen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 23:** Plaque-erzeugende Aktivität sowie lytische Effekte, die nach der Behandlung der STEC-2e-Stämme mit Norfloxacin bzw. dem optimalen exogenen Faktor in deren filtrierten Kulturüberständen zu beobachten waren

**A** Große, trübe Plaques    **B** Kleine, trübe Plaques    **C** Große, klare Plaques    **D** Kleine, klare Plaques  
**E** bzw. **F** Lytischer Effekt der Kulturüberstände der Stämme P5196/03-2 und P5194/03-2  
**G** Positivkontrolle *E. coli* 2771/97 (kleine, trübe Plaques)    **H**-Negativkontrolle *E. coli* DH5α (keine Plaques)



Tabelle 30: Plaque-erzeugende Aktivität bei STEC-2e-Stämmen unter dem Einfluss von Norfloxacin bzw. dem jeweils optimalen exogenen Faktor (Ergebnisse des Plaquetests)

Pathovar	Stamm	Plaque-erzeugende Aktivität							
		Norfloxacin (f. c. 0,5 µg/ml)			Optimaler exogener Faktor				
		Induktion Plaque- erzeugen- der Aktivität	Konzen- tration der Plaque- erzeugen- den Aktivität [PbE/ml]	Plaque- Morpho- logie	Faktor	Dosis	Induktion Plaque- erzeugen der Aktivität	Konzen- tration der Plaque- erzeugen- den Aktivität [PbE/ml]	Plaque- Morpho- logie
EDEC	4946/00	ja	3.440	klar, trüb	ENR	0,008 µg/ml	ja	4.080	klar
	82/02	ja	1.210	groß, trüb	TC	64 µg/ml	ja	6.600	groß, trüb
	P5413/04-1	ja	120	trüb	UV	312 nm 30 s	ja	2.800	trüb
	P5196/03-2	nein	0	-	UV	312 nm 30 s	nein	0	-
	P5194/03-2	nein	0	-	MMC	0,5 µg/ml	nein	0	-
	299	nein	0	-	MMC	0,5 µg/ml	nein	0	-
	P868/02	nein	0	-	MMC	0,5 µg/ml	nein	0	-
	2947/02-2	nein	0	-	AMX	256 µg/ml	nein	0	-
	2316/04-2	nein	0	-	ENR	0,008 µg/ml	nein	0	-
	3379/02	nein	0	-	AMX	2 µg/ml	nein	0	-
EDEC/ETEC	1485/03	ja	1.900	groß, klar	ENR*	1 µg/ml	ja	4.560	groß, klar
	42/02	ja	1.583	groß, klar	AMX	256 µg/ml	ja	8.600	groß, klar
	P106/03-1	ja	1.530	groß, klar	AMX	256 µg/ml	ja	21.280	groß, klar
	P4470/03-1	ja	1.300	groß, klar	AMX	2 µg/ml	ja	121.200	sehr klein
	P8615/00-1	ja	1.100	groß, trüb	ENR	0,015 µg/ml	ja	16.400	groß, trüb
	E57	ja	300	sehr klein	MMC	0,5 µg/ml	ja	860	klein

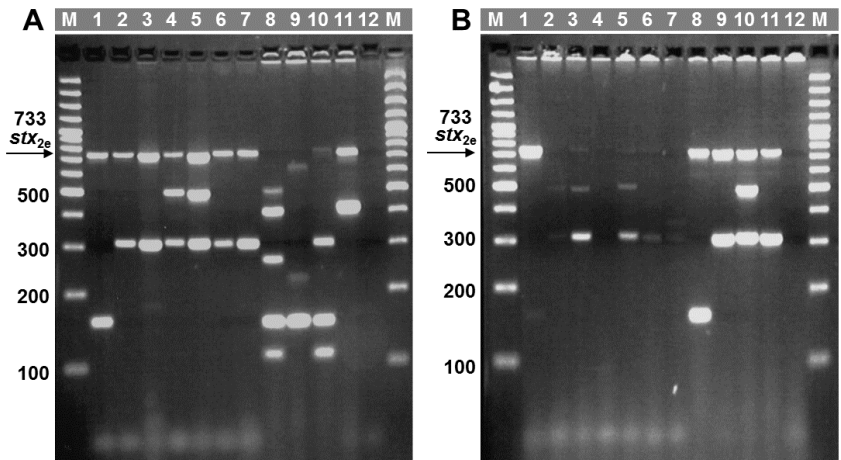
Fortsetzung der Tabelle 30 auf der nächsten Seite



#### 4.5.3 Untersuchungen auf *stx*<sub>2e</sub>-positive Bakteriophagen

Reagierten Kulturüberstände im Plaquetest positiv, dann wurden einzelne Plaques mit sterilen Pasteurpipetten ausgestochen und in je 500 µl SM-Puffer überführt. Diese Plaque-Suspensionen wurden mittels Multiplex-PCR auf das Vorkommen von *stx*<sub>2</sub>-spezifischer DNS untersucht. Parallel dazu wurden die filtrierten Kulturüberstände der beiden unterschiedlich behandelten Ansätze (Norfloxacin sowie jeweils optimaler exogener Faktor) dieser Stämme mit dem *stx*<sub>2e</sub>-Phagentest untersucht.

Die mittels Multiplex-PCR überprüften Plaques lieferten in keinem einzigen Fall ein *stx*<sub>2</sub>-spezifisches Amplifikat (Daten nicht gezeigt). Der *stx*<sub>2e</sub>-Phagentest (Multiplex-PCR-Untersuchung der Gemische aus dem filtrierten Kulturüberstand eines behandelten STEC-2e-Stammes und dem Empfängerstamm *E. coli* DH5α in LB-Medium) ergab entweder eine schwächer ausgeprägte *stx*<sub>2</sub>-spezifische Bande als die entsprechende Bande im reinen filtrierten Kulturüberstand desselben Stammes oder das entsprechende Amplifikat fehlte. Anders war dies bei dem *E. coli*-Kontrollstamm 2771/97 (Träger des induzierbaren, *stx*<sub>2e</sub>-konvertierenden Phagen φP27; *stx*<sub>2e</sub><sup>+</sup>, *estap*<sup>+</sup>). Hier war die aus der Bouillon-Kultur des *stx*<sub>2e</sub>-Phagentests amplifizierte *stx*<sub>2</sub>-spezifische Bande (733 bp) stets stärker ausgeprägt als im ursprünglichen filtrierten Kulturüberstand selbst, das *estap*-Gen (Bande bei 158 bp) war dagegen nicht amplifiziert worden. Die Ergebnisse der Multiplex-PCR-Analyse für diesen STEC-Kontrollstamm sowie einige *E. coli*-Feldstämme sind in der **Abbildung 24** dargestellt.



**Abbildung 24:** (A) Ergebnis der Multiplex-PCR-Analyse von filtrierten Kulturüberständen ausgewählter STEC-2e-Stämme und (B) Ergebnis des *stx*<sub>2e</sub>-Phagentests für die entsprechenden Stämme

Spur	Bildteil A	Spur	Bildteil B
1	<i>E. coli</i> 2771/97, beh. mit NFX	1	<i>E. coli</i> 2771/97, beh. mit NFX,
2	<i>E. coli</i> P868/02, beh. mit NFX	2	<i>E. coli</i> P868/02, beh. mit NFX
3	<i>E. coli</i> P868/02, beh. mit MMC	3	<i>E. coli</i> P868/02, beh. mit MMC
4	<i>E. coli</i> P5413/04-1, beh. mit NFX	4	<i>E. coli</i> P5413/04-1, beh. mit NFX
5	<i>E. coli</i> P5413/04-1, beh. mit UV	5	<i>E. coli</i> P5413/04-1, beh. mit UV
6	<i>E. coli</i> P5194/03-2, beh. mit NFX	6	<i>E. coli</i> P5194/03-2, beh. mit NFX
7	<i>E. coli</i> P5194/03-2, beh. mit MMC	7	<i>E. coli</i> P5194/03-2, beh. mit MMC
8	<i>E. coli</i> Abbotstown	8	<i>E. coli</i> 2771/97
9	<i>E. coli</i> B41	9	<i>E. coli</i> P868/02
10	<i>E. coli</i> E57	10	<i>E. coli</i> P5413/04-1
11	<i>E. coli</i> TTP-1	11	<i>E. coli</i> P5194/03-2
12	LB-Medium	12	<i>E. coli</i> DH5α, Negativkontrolle
1 - 7	filtrierte Kulturüberstände vor Einsatz im Plaquetest	1 - 7	Bouillon-Kulturen des <i>stx</i> <sub>2e</sub> -Phagentests (Gemische aus dem filtrierten Kulturüberstand des behandelten Stammes und <i>E. coli</i> DH5α in LB-Medium)
8 - 11	Standard-Schüttelkulturen von <i>E. coli</i> -Kontrollstämmen (Positivkontrollen der Multiplex-PCR)	8 - 12	Standard-Schüttelkulturen der Positivkontrolle, der Feldstämme und der Negativkontrolle

**Erläuterungen:** beh. behandelt; M Molekularmassenstandard; MMC Mitomycin C; NFX Norfloxacin; UV UV-Licht (312 nm, 30 s)

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Stx2e-kodierende *E. coli*-Feldstämme von Schweinen (STEC-2e) das Stx2e auch *in vitro* bilden und freisetzen können und ob exogene, antibakterielle Noxen, diese Bakterien zur Freisetzung von Stx2e und *stx*<sub>2e</sub>-kodierenden Bakteriophagen stimulieren. Neben den bekanntermaßen Phagen-induzierenden Faktoren Mitomycin C und UV-Licht lag der Schwerpunkt der Betrachtung dabei auf antimikrobiellen Wirkstoffen, und zwar insbesondere auf den beim Schwein therapierelevanten Antiinfektiva Amoxicillin (AMX), Colistin (COL), Enrofloxacin (ENR), Erythromycin (EM), Neomycin (NEO) und Tetrazyklin (TC).

### 5.1 Stx2e-Nachweis mittels ELISA-Technik

Die Quantifizierung des von porcinen STEC-2e-Feldstämmen bei der Anzucht *in vitro* gebildeten Stx2e war die größte methodische Herausforderung dieser Arbeit. Es mussten sowohl die Stx2e-Bildung der STEC-2e-Stämme unter Standardanzuchtbedingungen als auch gegebenenfalls höhere oder niedrigere Stx2e-Konzentrationen in der Kultur erfasst werden, sobald die Bakterien einer Noxe ausgesetzt worden waren. Mit kommerziellen Stx-ELISA-Systemen ist der Nachweis der Stx1- und Stx2-Subtypen möglich, jedoch werden entweder nicht alle Stx-Subtypen erkannt oder die Sensitivität der Tests ist für manche Stx-Subtypen geringer. Laut Willford *et al.* (2009) erkennen weder der Ridascreen® Verotoxin Immunoassay noch die ELISA-Systeme Premier™ EHEC von Meridian Bioscience, Inc. und ProSpect™ Shiga Toxin *E. coli* Microplate von Remel den Subtyp Stx2e. Allerdings widerspricht das hinsichtlich des Ridascreen® Verotoxin Immunoassay den Ergebnissen anderer Autoren, die Shigatoxin mit diesem ELISA sehr wohl auch im Kulturmateriel von *stx*<sub>2e</sub>-positiven Stämmen (Beutin *et al.* 2007) und in Stuhlproben fanden, die zuvor in der LightCycler-PCR ein *stx*<sub>2e</sub>-spezifisches Signal gegeben hatten (Pulz *et al.* 2003). Ein weiterer Grund, weshalb in dieser Arbeit von der Verwendung von käuflichen ELISA-Systemen zum Stx2e-Nachweis abgérückt wurde, waren deren Kosten, die mit bis zu 4,20 € pro Reaktion sehr hoch lagen. Stattdessen wurde mit zwei kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern der Firma Sifin Diagnostics GmbH, Berlin selbst ein Stx2e-Antigen-ELISA etabliert.

Gegenüber dem Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT), der gemäß Fachliteratur den Goldstandard darstellt, birgt der ELISA gerade bei STEC-2e-Stämmen den Nachteil, dass er weniger sensitiv ist (Downes *et al.* 1989, Paton und Paton 1998). Der Nachweis einer nur moderaten Stx-Produktion gelingt deshalb häufiger mit dem Vero-ZT als mit einem Enzymimmunoassay (Cornick *et al.* 2002). Dies war auch bei der Evaluierung des kommerziellen Ridascreen® Verotoxin-ELISA (r-biopharm AG, Darmstadt) zu beobachten, wo bei 29 von 34

(85,3 %) *stx<sub>2e</sub>*-kodierenden und im Vero-ZT positiven *E. coli*-Isolaten mit dem ELISA Stx2e detektiert wurde (Beutin *et al.* 2007). Mit dem gleichen ELISA war in einer anderen Untersuchung Stx2e sogar nur bei 7 von 11 *stx<sub>2e</sub>*- und Vero-ZT-positiven Stämmen (63,6 %) nachzuweisen (Friedrich *et al.* 2002). Stämme, die für die Subtypen *stx<sub>2c</sub>* oder *stx<sub>2d</sub>* kodierten und im Vero-ZT positiv reagiert hatten, zeigten sich auch im ELISA häufiger positiv (20 von 23 Stämmen, 86,9 % bzw. 10 von 10 Stämmen, 100 %). Ein ELISA bietet gegenüber dem Vero-ZT aber den Vorteil des deutlich geringeren Labor- und Zeitaufwands (Downes *et al.* 1989). Da in der Dissertation eine große Anzahl an Stämmen, verschiedenen Zellfraktionen sowie unterschiedlichen Bakterienkulturen auf Stx2e-Bildung untersucht werden mussten, ergab sich ein hohes Probenaufkommen, das mit einem ELISA schneller bearbeitet werden konnte. Die mit dem BugBuster®-Kit hergestellten Lysatüberstände der STEC-2e-Feldstämmen waren außerdem wegen des darin enthaltenen Detergens und dessen Zytotoxizität nicht dazu geeignet, in der Zellkultur getestet zu werden. So war bei Proben mit geringer Stx2e-Konzentration die Stx2e-spezifische Zytotoxizität vor dem Hintergrund der Toxizität des Detergens nicht auszulesen.

Es ist logisch und in der Literatur auch mit Daten belegt, dass die Stx-bedingte zytotoxische Aktivität in einer STEC-Bakterienkultur mit der darin enthaltenen Menge an Stx-Antigen zusammenhängt (O'Brien und Laveck 1982). Über qualitativ übereinstimmende Ergebnisse im ELISA und im Zytotoxizitätstest berichteten schon mehrere Autoren. So wurden die Polymyxin-Extrakte von 67 *E. coli*-Stämmen hinsichtlich des Vorhandenseins von Shigatoxin und des vorhandenen Stx-Typs mit einem Stx1/Stx2-ELISA und mit dem Vero-ZT in identischer Weise klassifiziert (Speirs und Akhtar 1991). Downes *et al.* (1989) erzielten mit zwei selbst entwickelten Sandwich-ELISAs für Stx1 und Stx2 hinsichtlich der erkannten Toxintypen die gleichen Resultate wie mit einem HeLa- und einem Verozell-Neutralisationstest. Ein Gb3-ELISA, der für den Nachweis von Stx und Stx1 konzipiert war, erkannte die gleichen *E. coli*-Stämme als Stx- bzw. Stx1-positiv wie ein HeLa-Zell-Neutralisationstest, in welchem anti-Stx-Antiserum eingesetzt wurde (Ashkenazi und Cleary 1990). Es konnte deshalb erwartet werden, dass sich auch die von einem Stamm gebildete Menge an zytotoxisch aktivem Stx2e in der im Stx2e-ELISA gemessenen Antigenkonzentration widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit korrelierten tatsächlich die für alle 365 STEC-2e-Stämme im Stx2e-ELISA ermittelten Werte signifikant mit denjenigen im Vero-ZT ( $p < 0,001$ , siehe **Abbildung 14**). Nach meiner Kenntnis ist dieser quantitative Zusammenhang zumindest für STEC-2e-Stämme vorher noch nicht so präzise belegt worden. Die nachgewiesene Korrelation ließ es ebenfalls gerechtfertigt erscheinen, den Stx2e-ELISA in den Stimulationsversuchen als Methode zur Stx2e-Quantifizierung einzusetzen. Allerdings wurde aus der Untersuchung der Kulturüberstände auch ersichtlich, dass der ELISA offenbar wegen einer höheren Nachweis-

grenze solche Stämme nicht erfasste, die nur wenig Stx2e freigesetzt hatten. So reagierten nur 79 (21,6 %) der 365 STEC-2e-Stämme im ELISA positiv, dagegen 357 (97,5 %) Stämme im Vero-ZT. Bei STEC-Stämmen, welche für Stx1, Stx2 oder für andere Subtypen von Stx1 bzw. Stx2 als Stx2b, Stx2e oder Stx2f kodieren, scheint diese Diskrepanz zwischen ELISA und Vero-ZT weniger stark sein. So stellten Beutin *et al.* (2007) bei der Evaluierung des Ridascreen®-ELISA fest, dass die Ergebnisse von ELISA und Vero-ZT nur bei Stämmen der Stx2-Subtypen Stx2e, Stx2f und Stx2-O118 (Stx2b) voneinander abwichen.

Nach den eigenen Befunden ist der Vero-ZT zur Detektion und Quantifizierung geringer Stx2e-Mengen somit besser geeignet als der Stx2e-ELISA. Für die Versuche zur Stimulation von STEC-2e-Stämmen mit antimikrobiellen Wirkstoffen und anderen Noxen wurde dennoch der Stx2e-ELISA als Nachweissystem bevorzugt. In diesen Versuchen sollte insbesondere die Zunahme der Stx2e-Freisetzung erfasst werden, die eventuell durch die Einwirkung von Noxen auf die Bakterien provoziert wurde. Dabei sollten nur entsprechend große Anstiege der Stx2e-Konzentrationen als stimulative Effekte bewertet werden. Dies schien mit dem Stx2e-ELISA und den angewendeten hohen Cut-Offs in hinreichendem Maße möglich zu sein.

Die Festlegung eines Cut-Offs ist ein kritischer Punkt bei der Etablierung eines ELISA. Zur Ermittlung eines solchen Cut-Offs wäre die Verwendung eines oder mehrerer bekannter Standards optimal. Lösungen mit aufgereinigtem Stx2e in definierter Konzentration standen jedoch nicht zur Verfügung. Deshalb wurden zehn *stx<sub>2e</sub>*-negative *E. coli*-Stämme verwendet, um zunächst das „Hintergrundrauschen“ im Stx2e-ELISA zu erfassen und auf dieser Datengrundlage dann in einem zweiten Schritt den Cut-Off festzulegen. Da die Kulturüberstände ungefähr doppelt so hohe OD %-Werte erzielten wie die Lysatüberstände, wurde für jeden dieser Probenotypen ein eigener Cut-Off festgelegt. Die resultierenden Cut-Off-Werte waren relativ hoch, besonders für die Kulturüberstände. Diese hohen Werte wurden vor allem durch die Messwerte des *E. coli*-Stammes 987P verursacht. Da es sich bei diesem Stamm aber um ein *stx<sub>2e</sub>*-negatives *E. coli*-Isolat von einem Schwein handelte, waren ähnlich hohe Werte auch bei *stx<sub>2e</sub>*-positiven *E. coli*-Stämmen mit geringer oder fehlender Stx2e-Bildung nicht auszuschließen. Den Cut-Off dann an der Obergrenze des 95 %-Konfidenzintervalls (gleichbedeutend mit der Summe aus arithmetischem Mittelwert und 2-facher Standardabweichung) der Messwerte von Negativkontrollen festzulegen, ist eine übliche Methode zur Festlegung von Cut-Off-Werten (Singh 2006). Teils wird sogar die 3-fache Standardabweichung zum arithmetischem Mittel hinzuaddiert (Lage *et al.* 1996, Pachner *et al.* 1997).

Zur Sicherung der diagnostischen Qualität mussten sich die Messwerte im Stx2e-ELISA auch mit geringer Streubreite reproduzieren lassen, weshalb dies anhand der beiden rekombinanten Stx2e-Chargen „rStx2e/01/05“ und „rStx2e/03/05“ gezielt geprüft wurde. Die Inter-

assay-Varianz ist dabei ein Maß für die Konstanz der Messung, auch wenn sie an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wird. Die Intraassay-Varianz gibt Aufschluss darüber, in welchem Ausmaß Messwerte innerhalb desselben Testdurchlaufs streuen. Gemäß Angaben der Firma Salimetrics LLC, Carlsbad, USA, gelten Variationskoeffizienten bis 15 % (Interassay-Varianz) bzw. bis 10 % (Intraassay-Varianz) als akzeptabel (Salimetrics 2014). Laut der Richtlinie der EMA zur bioanalytischen Methodenvalidierung sollten die CV-Werte der Intraassay- sowie der Interassay-Varianz 15 %, höchstens jedoch 20 %, nicht überschreiten (EMA 2011). In den Versuchen zur Interassay-Varianz des Stx2e-ELISA betrugen die Variationskoeffizienten zwischen 9,9 % und 21 % (im Mittel 15,1 %, siehe **Kapitel 4.2**). Für die Intraassay-Varianz ergaben sich, abhängig von der Verdünnungsstufe, Variationskoeffizienten zwischen 1,2 % und 3,4 % mit einem resultierenden Gesamt-Variationskoeffizienten von 2,4 %. Die Reproduzierbarkeit der Messwerte kann daher als hinreichend eingestuft werden. Andere Arbeitsgruppen erzielten mit ihren Systemen teilweise bessere (Parma *et al.* 2012), aber auch durchaus schlechtere Werte (Parma *et al.* 2012, Jenko *et al.* 2014).

Laut „Produktliste 2015“ der Firma Sifin Diagnostics GmbH (Sifin 2015) richten sich die Antikörper SIFIN VT 136/8-H4 bzw. SIFIN VT 135/6-B9 gegen Epitope der B- bzw. der A-Untereinheit von Stx2. Während der Etablierung des Stx2e-ELISA konnte gezeigt werden, dass STEC-Stämme, die für die Subtypen Stx2a, Stx2c, Stx2d sowie Stx2e kodierten, im Stx2e-ELISA ebenfalls ein positives Signal liefern (siehe **Tabelle 13**). Stämme mit den Genen für Stx1, Stx1c, Stx2b und Stx2f erzeugten dagegen kein Signal. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass entweder diese Stämme nur wenig Toxin bildeten oder zumindest einer der monoklonalen Antikörper keine hinreichende Affinität für diese Stx-Subtypen besaß. Da die Frage, ob die genannten monoklonalen Antikörper auch andere Stx2-Subtypen als Stx2e erkennen konnten, die Zielrichtung der Dissertation nicht berührte, wurde sie nicht weiter verfolgt. Für die geplanten Untersuchungen bedeutete das breite Stx2-Subtypen-Spektrum des Stx2e-ELISA keine Fehlerquelle, denn mit den von Nakao *et al.* (2002) entwickelten PCR-Tests war zuvor festgestellt worden, dass die porcinen STEC-2e-Feldstämme alle für Stx2e kodierten und Gene für *stx<sub>2a</sub>*, *stx<sub>2b</sub>*, *stx<sub>2c/2d</sub>* und *stx<sub>2f</sub>* in keinem Fall vorhanden waren.

Von den 7 bei der Etablierung eingesetzten *stx<sub>2e</sub>*-positiven Kontrollstämmen reagierten die beiden Stämme Fac9/1 und E57 im Stx2e-ELISA sowohl mit dem Kulturüberstand als auch mit dem USL-Überstand negativ. Wahrscheinlich lag die Stx2e-Antigenkonzentration auch bei diesen beiden Kontrollstämmen einfach unter der Nachweisgrenze des Stx2e-ELISA. So enthielt der Kulturüberstand von Stamm E57 nur die geringe zytotoxische Aktivität von 154,1 CD<sub>50</sub>/ml. Ähnlich niedrige Werte an Zytotoxizität fanden auch schon andere Untersucher bei diesem Stamm (Konowalchuk *et al.* 1977). In allen Stx2e-ELISA-positiven Kultur-



überständen der vorliegenden Arbeit waren aber mindestens 300 CD<sub>50</sub>/ml nachweisbar. Und in gleicher Weise wie in den eigenen Untersuchungen reagierte der Stamm E57 bei Beutin *et al.* (2007) nur im Vero-ZT positiv, nicht aber im Ridascreen® Verotoxin ELISA. Für den Stamm Fac9/1 sind keine Daten über das Stx2e-Bildungsvermögen publiziert.

## **5.2 Stx2e-Bildung und -Freisetzung bei STEC-2e-Stämmen vom Schwein unter Standardanzuchtbedingungen**

In der vorliegenden Dissertation bildeten fast alle 365 untersuchten STEC-2e-Feldstämme Stx2e. Präzise waren es 357 (97,8 %) Stämme, in deren Kulturüberstand mit dem Vero-ZT eine zytotoxische Aktivität nachweisbar war. Die an den betroffenen Verozellen beobachteten pathomorphologischen Veränderungen wie Verlust von Spindelform und Zelladhärenz, Zerstörung des konfluenten Monolayers, Abrundung und Verkleinerung der Zellen, Schrumpfen des Zellkerns, Vakuolenbildung im Zytoplasma sowie Chromatinkondensation deuteten auf die zytotoxische Aktivität eines Shigatoxins hin (Carbonell *et al.* 1997, Salvadori *et al.* 2001). Im Stx2e-ELISA reagierten zwar insgesamt nur ca. zwei Drittel der Stämme positiv, doch dürfte die kleinere Nachweisquote in diesem System an den nur geringen Stx2e-Mengen einerseits und der höheren Nachweisgrenze des Stx2e-ELISA andererseits gelegen haben. Ähnliche Unterschiede in den Stx-Nachweisquoten zwischen Zellkulturtests und immunologischen Tests schilderten auch schon mehrere andere Autoren. So konnte Stx2e bei 76 von 110 (69,1 %) STEC-2e-Stämmen mit einem P<sub>1</sub>-Glykoproteinrezeptor-Enzymimmunassay (P<sub>1</sub>-g-EIA) detektiert werden, während mit dem Vero-ZT zuvor bei allen 110 Stämmen eine zytotoxische Aktivität festgestellt worden war (Beutin *et al.* 2008). Der Anteil immunologisch positiver Stämme liegt in jener Arbeit somit in demselben Größenbereich wie in dieser Dissertation. In einer früheren Studie von Beutin *et al.* (2007) reagierten allerdings sogar 29 von 34 (85,3 %) Vero-ZT-positiven STEC-2e-Stämmen auch im Ridascreen®-ELISA positiv. Der hier höhere Anteil an ELISA-positiven Stämmen könnte der Tatsache geschuldet sein, dass die Stämme vor ihrem Einsatz im Ridascreen®-ELISA obligatorisch mit dem Zusatz von Mitomycin C (*f. c.* 0,05 µg/ml) angezüchtet worden waren.

### **Stx2e-Konzentrationen in den STEC-2e-Kulturen**

Es war auffällig, dass in den Kulturüberständen der untersuchten STEC-2e-Feldstämme nur wenig zytotoxische Aktivität enthalten war. Bei 238 Stämmen (65,2 %) lag die zytotoxische Aktivität der Kulturüberstände nur zwischen 20 und 500 CD<sub>50</sub>/ml. Im Vergleich dazu lagen die Werte der beiden positiven Kontrollstämme humanen Ursprungs bei 4.304 CD<sub>50</sub>/ml (Stamm 2771/97; *stx*<sub>2e</sub><sup>+</sup>) und 10.052 CD<sub>50</sub>/ml (Stamm EDL 933; *stx*<sub>2a</sub><sup>+</sup>) und damit um ein Vielfaches höher. Lediglich sechs Feldstämme wiesen eine Aktivität von über 4.000 CD<sub>50</sub>/ml auf und

erreichten somit sogar höhere Werte als der STEC-2e-Stamm 2771/97. Auch im Stx2e-ELISA waren die Werte der meisten STEC-2e-Feldstämme niedrig. Abgesehen davon, dass in diesem Test überhaupt nur 64,9 % der Stämme positiv reagierten, lag die Mehrzahl dieser positiven Stämme (91,1 %) im Parameter "Gesamt-Stx2e" (Summe aus zellassoziiertem Stx2e und freiem Stx2e) unter dem Wert von 370 OD %. Dagegen erzielte der humane STEC-2e-Kontrollstamm 2771/97 nach 5-stündiger Anzucht bei 37 °C bereits allein mit seinem Kulturüberstand den Wert 1.498 OD % (gemittelt aus 8 Messungen).

Diese Befunde stimmen mit publizierten Beobachtungen überein, wonach STEC-2e-Stämme von Schweinen unabhängig von ihrer Stimulation mit Mitomycin C signifikant weniger Stx2e bildeten ( $p < 0,001$ ) als solche Stämme vom Menschen (Beutin *et al.* 2008). Auch werden von humanen STEC-Stämmen, welche für Stx1 oder andere Stx2-Subtypen kodieren, größere Stx-Mengen gebildet, als es in der vorgelegten Dissertation bei dem Großteil der Stämme für Stx2e der Fall war. So waren bei zwei von drei Stx2- und/oder Stx1-positiven EHEC-Stämmen (O157:H7) in den Kulturüberständen mehr als 1.000 CD<sub>50</sub>/ml nachweisbar (Grif *et al.* 1998). Außerdem enthielten die Ultraschall-Lysate verschiedener EHEC-O157:H7-Stämme nach den Ergebnissen in einem Zytotoxizitätstest mit HeLa-Zellen mindestens 10<sup>4</sup> CD<sub>50</sub>/ml (Karch *et al.* 1986).

Verschiede Autoren geben an, dass eine vergleichsweise niedrige Stx-Produktion ein Charakteristikum von STEC-Stämmen ist, welche von Schweinen mit Ödemkrankheit isoliert werden (Konowalchuk *et al.* 1978, Smith *et al.* 1983, MacLeod und Gyles 1990). Manche STEC-2e-Stämme produzieren nur 0,1 - 1 % der Stx-Menge, die von Stx1- und Stx2-bildenden STEC-Stämmen produziert wird (MacLeod und Gyles 1989). Marques *et al.* (1986) fanden unter *E. coli*-Isolaten mit den O-Typen O139 und O141, die von ED-kranken Schweinen isoliert worden waren, keinen einzigen Stamm mit hoher zytotoxischer Aktivität. Vielmehr stellten sie bei 17 Stämmen keine und bei 64 nur eine geringe zytotoxische Aktivität fest. Allerdings verwendeten die Autoren in ihren Untersuchungen HeLa-Zellen, welche weniger empfindlich gegenüber Stx2e sind als Verozellen (Marques *et al.* 1987, Gannon und Gyles 1990, Acheson 1999). In einer späteren Untersuchung des gleichen Erstautors betrug die Stx2e-bedingte Verozell-Zytotoxizität der USL- und Kulturüberstände des EDEC-Stammes S1191 nur 0,1 % derjenigen Zytotoxizität, die bei dem EHEC-Stamm 933 gemessen wurde (Marques *et al.* 1987). Auch von bovinen STEC-Stämmen ist bekannt, dass sie im Mittel signifikant weniger Stx1 bzw. Stx2 produzieren als humane EHEC-Stämme, selbst wenn man sie mit Mitomycin C behandelt (Ritchie *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010, Taylor *et al.* 2011). Dabei korreliert die Stx-Produktion der STEC-Stämme nicht nur mit der Herkunft von Rind oder Mensch, sondern auch mit der Zugehörigkeit des Stammes zu bestimmten genetischen Linien. Linien mit besonders starker Stx-Bildung sind bei STEC des

Serotyps O157:H7 die Linien LI (Stx2) und LI/II (Stx2 und ggf. Stx2c) (Dowd und Williams 2008, Lowe *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010).

Die wenigen Publikationen, die es zur Stx2e-Bildung bei *stx*<sub>2e</sub>-positiven Stämmen von Schweinen gibt, verwendeten nur wenige Stämme (Uemura *et al.* 2004) oder stammen aus der Anfangsphase der STEC-Forschung, in der die verschiedenen STEC- und Stx-Subtypen noch nicht bekannt waren. Immerhin bildeten die porcinen *E. coli*-Stämme (n = 14, darunter 6 Stämme von Schweinen mit ED) auch in der Untersuchung von Smith *et al.* (1988) deutlich weniger Toxin als die vergleichsweise dort geprüften bovinen Stämme (n = 20). Getestet wurden Kulturüberstände im Vero-ZT. Die Toxintiter der bovinen Stämme waren vereinzelt 1.000-fach höher als die der porcinen Stämme.

Die hier mit dem Vero-ZT gemessenen Stx2e-Konzentrationen sind deutlich niedriger als diejenigen, die eine Forschergruppe bei porcinen STEC in Kanada fand (Gannon *et al.* 1988). So ermittelten Gannon *et al.* (1988) Werte von ca.  $10^3$  bis  $10^7$  CD<sub>50</sub>/ml. Die Werte einiger kanadischer Isolate überstiegen somit den Maximalwert von  $8,2 \times 10^3$  CD<sub>50</sub>/ml, den hier der Überstand von Stamm P7554/06-1 erreichte. Da jedoch weder die Anzucht der zu prüfenden STEC-Stämme noch die Durchführung des Vero-ZT standardisiert sind, lassen sich die genannten Differenzen am ehesten durch methodische Unterschiede erklären. So wurden die untersuchten *E. coli*-Isolate in der Studie von Gannon *et al.* (1988) länger (24 h statt 5 h) und auch in einem anderem Nährmedium (BHI- anstatt LB-Medium) inkubiert. Zudem wurde die für Verozellen zu 50 % zytotoxische Dosis (CD<sub>50</sub>/ml) nicht mit dem MTT-Test bestimmt, sondern mittels mikroskopischer Beurteilung des mit Kristallviolett gefärbten Verozell-Monolayers. Ohne vergleichende Untersuchung in demselben Testformat ist allerdings nicht auszuschließen, dass in Kanada potentere STEC-2e-Stämme zirkulieren als in Deutschland.

### **Sekretion und periplasmatische Speicherung von Stx2e**

Bei den in dieser Arbeit untersuchten STEC-2e-Stämmen wurde das Stx2e bei fast 83 % der 237 Stämme, die überhaupt im Stx2e-ELISA positiv reagierten, zellassoziiert vorgefunden. Bei ca. 67 % der Stämme lag Stx2e sogar nur bakterienzellassoziiert vor und nicht auch im Kulturüberstand. Diese Befunde decken sich mit den Beobachtungen anderer Untersucher. So beschrieben gleich mehrere Arbeitsgruppen eine bevorzugte Lokalisation von Stx2e in der Bakterienzelle von STEC-2e-Isolaten aus ED-kranken Schweinen (Davis *et al.* 1961, Clugston und Nielsen 1974, Marques *et al.* 1986, Marques *et al.* 1987, MacLeod und Gyles 1989, Uemura *et al.* 2004). Es ist anzunehmen, dass sich das mit dem Stx2e-ELISA detektierte Stx2e überwiegend im bakteriellen Periplasma befand. Die Synthese der Stx2e-Subunits, StxA2e und StxB2e, erfolgt zunächst an den Ribosomen (Jackson *et al.* 1987a, Jackson *et al.* 1987b, China und Goffaux 1999, Beckwith 2013). Danach werden die Unter-

einheiten, vermutlich Sec-abhängig, über die Zytoplasmamembran in das Periplasma transloziert, wo die Zusammensetzung (Assemblierung) zum Stx2e-Holotoxin erfolgt (Oloomi *et al.* 2006, McGannon *et al.* 2010, Kim *et al.* 2011). Die Beobachtung, dass man die Ausbeute an Stx erhöhen kann, wenn man Proteine aus dem periplasmatischen Raum mit einer Polymyxin-B-Behandlung der Bakterienzellen herauslöst, ist ein starker Beleg dafür, dass auch das Stx2e-Holotoxin periplasmatisch angereichert ist (MacLeod und Gyles 1990).

Mit dem Stx2e-ELISA wurde vermutlich nur weitgehend intaktes Stx2e-Holotoxin detektiert, da jeder der beiden verwendeten Antikörper laut Herstellerangaben nur an eine der beiden Subunits bindet und deshalb ein positives Signal nur durch das Holotoxin zustande kommen kann. Wenngleich Stx2e am häufigsten zellassoziiert vorlag, ließ sich Stx2e nach der Standardanzucht bei immerhin 17 % der ELISA-positiven Stämme ausschließlich als freies Stx2e im Kulturüberstand nachweisen. Zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine überzeugenden Belege für ein Stx-Sekretionssystem, durch welches Shigatoxine aus dem Periplasma nach außen geschleust werden (Kim *et al.* 2011). Nach gegenwärtigem Kenntnisstand gibt es folgende Möglichkeiten, wie Stx2e von STEC-2e-Feldstämmen in das umgebende Milieu gelangt sein kann: Durch die Phagen-vermittelte Lyse des Bakteriums (Makino *et al.* 1999, Wagner *et al.* 1999, Wagner *et al.* 2001a, Wagner und Waldor 2002) oder die Abschnürung von Membranvesikeln, in welche das periplasmatische Stx eingeschlossen wird (Kolling und Matthews 1999, Yokoyama *et al.* 2000a, Dutta *et al.* 2004). Da die Kulturüberstände in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung im Stx2e-ELISA und im Vero-ZT keinem Verfahren unterworfen wurden, um darin enthaltene Vesikel aufzuschließen, scheint das in Vesikeln befindliche Stx2e bei den ermittelten Daten keine Rolle gespielt zu haben. Das bloße „Heraussickern“ von Stx2e aus den Bakterienzellen wegen einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Membran kommt als Ursache für das Auftreten von Stx2e im Kulturüberstand ebenfalls in Betracht (Donohue-Rolfe und Keusch 1983, Karmali *et al.* 1985). *In vivo* mag die Zerstörung der STEC-Bakterienzelle durch Effektoren des Schweine-Immunsystems einen weiteren Mechanismus der Toxinfreisetzung darstellen (Wagner und Waldor 2002).

### **Korrelation der Stx2e-Bildung und/oder -Freisetzung mit dem Virulenzgenprofil der STEC-2e-Stämme**

Betrachtet man die Stx2e-Bildung unter Standardanzuchtbedingungen in Abhängigkeit vom Virulenzgenprofil der Stämme, waren bezüglich des insgesamt in der Kultur vorhandenen Stx2e („Gesamt-Stx2e“) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pathovaren EDEC und sonstige STEC-2e vorhanden (siehe **Abbildung 11**). Hinsichtlich der beiden Fraktionen „zellassoziiertes Stx2e“ (Lysatüberstände) und „freies Stx2e“ (Kulturüberstände) traten jedoch deutliche Unterschiede zwischen allen drei Pathovaren auf. So wiesen die typischen

Ödemkrankheitserreger (EDEC; *stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>*, *fedA<sup>+</sup>*) signifikant höhere Gehalte an zellassoziertem Stx2e auf als Stämme, die zusätzlich noch Enterotoxin-Gene (EDEC/ETEC; *stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>*, *fedA<sup>+</sup>*, *estap<sup>+</sup>/estb<sup>+</sup>/elt<sup>+</sup>*) oder aber ausschließlich das Stx2e-Gen besaßen (sonstige STEC-2e; *stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>*, *p* jeweils < 0,001, siehe **Kapitel 4.3.1**). Umgekehrt enthielten die Kulturüberstände der EDEC die signifikant niedrigsten Stx2e-Mengen, während sonstige STEC-2e das meiste freie Stx2e aufwiesen, gefolgt von den Stämmen, die Enterotoxine kodierten (*p* < 0,001, siehe **Kapitel 4.3.1**). Ein höherer Gehalt an zellassoziertem Stx2e und an Gesamt-Stx2e war zudem assoziiert mit klinischen Anzeichen der Ödemkrankheit bei dem Schwein, von dem der STEC-2e-Stamm isoliert worden war (*p* < 0,001). Von 178 Isolaten des Pathovars EDEC war knapp die Hälfte (48 %) mit der vorberichtlichen Angabe „Ödeme“ assoziiert. Andere Untersucher konnten hinsichtlich der *in vitro* gebildeten Stx-Menge im Mittel allerdings keine Unterschiede zwischen den Isolaten von erkrankten oder perakut verstorbenen Schweinen mit ED-Symptomen und den Isolaten von gesunden Schweinen feststellen (Gannon *et al.* 1988). Verglichen wurden dort jedoch ausschließlich die in den Kulturüberständen nachweisbare Zytotoxizität [CD<sub>50</sub>/ml], während andere Bakterienzellfraktionen nicht untersucht wurden. Im Gegensatz dazu fielen Unterschiede bezüglich der Stx2e-Menge in der vorliegenden Dissertation aber nur bei der Betrachtung des Gesamt-Stx2e sowie des zellassozierten Stx2e als hoch signifikant auf. In den Kulturüberständen waren zwar im Mittel ebenfalls unterschiedlich große Stx2e-Mengen zu messen, je nachdem ob die Stämme mit Ödemen assoziiert waren oder nicht, diese Differenz war jedoch nur schwach signifikant. Zudem stammten die Isolate der Gruppe der klinisch erkrankten Tiere bei Gannon *et al.* (1988) nicht nur von Schweinen mit Ödemkrankheit, sondern auch von perakut verstorbenen Tieren oder solchen mit PWD, so dass ein Vergleich mit den hier ermittelten Daten auch aus diesem Grund nur eingeschränkt möglich ist.

Die Beobachtung, dass Stx2e bei EDEC bevorzugt in der zellassozierten Fraktion lokalisiert ist, könnte darauf hinweisen, dass solche Stämme das Stx2e in ihrem periplasmatischen Spalt speichern und erst nach ihrer Anheftung an die Darmepithelzellen des Schweins freisetzen. Diese Freisetzung könnte man als Antwort der Bakterien auf die Konfrontation mit Produkten des Wirtes verstehen, z. B. mit Effektoren des lokalen Immunsystems. Cornick *et al.* (2000) ziehen eine solche Aktivierung von STEC ebenfalls in Betracht. Sie zeigten, dass für Schweine mit einem Stx2e-Titer von mindestens 1:4.096 in den Fäzes ein erhöhtes Risiko besteht, eine klinisch manifeste Ödemkrankheit zu entwickeln. Der fäkale Stx2e-Titer spiegelte dabei annähernd den im Darminhalt gemessenen Stx2e-Titer wider. Jedoch wiesen die Tiere mit den höchsten absoluten Stx2e-Titern im Ileum nicht auch automatisch die höchste Bakteriendichte auf der ilealen Darmschleimhaut auf. Daraus folgerten die Autoren, dass möglicherweise eine Stimulation der EDEC zur Stx2e-Produktion oder -Freisetzung in-

folge der Anheftung der Bakterien an das Darmepithel oder der Interaktion mit enteralen Metaboliten oder Mukus stattgefunden hat.

Bei den STEC-2e-Stämmen von Schweinen mit klinischen Anzeichen der ED wurden signifikant höhere Konzentrationen an Gesamt-Stx2e und auch an zellassoziiertem Stx2e gemessen als bei Stämmen von Schweinen ohne Anzeichen von ED ( $p < 0,001$ , t-Test). Dies weist darauf hin, dass das Stx2e-Bildungsvermögen ein wichtiges Kriterium der Virulenz derartiger STEC-Stämme sein könnte und dass diese mit den gewählten Testbedingungen *in vitro* geprüft werden kann. Die Daten untermauern aber auch, dass das Stx2e nicht allein die Pathogenese der ED bestimmt. Denn nur 4 von 46 (8,7 %) der als sonstige STEC-2e klassifizierten Isolate stammten nämlich von Tieren mit Ödemen, dagegen waren 85 von 178 (47,8 %) EDEC-Stämmen von Tieren mit Ödemen isoliert worden, obwohl sich sonstige STEC-2e- und EDEC-Stämme im Gesamt-Stx2e im Mittel nicht signifikant voneinander unterschieden. Jedoch besaßen die Stämme der EDEC-Gruppe, im Gegensatz zu denjenigen der sonstigen STEC-2e, F18-Fimbrien. Wahrscheinlich trägt erst dieser Adhäsionsfaktor im Wirt entscheidend dazu bei, dass EDEC an der Dünndarmschleimhaut der infizierten Schweine hohe Keimzahlen erreichen und damit so große Stx2e-Mengen in diesem Darmabschnitt anfluten, dass es zum Ausbruch der ED kommt (Fairbrother *et al.* 2005). Die Kolonisationsdichte im Dünndarm, bezogen auf Darmwand und -inhalt, beträgt nach einer Infektion mit EDEC-Bakterien bis zu  $10^9$  KbE/cm (Bertschinger und Pohlenz 1983, Bertschinger *et al.* 1990, Bertschinger und Gyles 1994).

Bisher sind keine differenzierten Untersuchungen zur Stx2e-Bildung bei porcinen STEC-Stämmen im Zusammenhang mit deren Virulenzprofil publiziert worden. Von Beutin *et al.* (2008) wurden zwar 110 *stx*<sub>2e</sub>-positive Stämme auf ihre Stx2e-Bildung hin untersucht. Unter diesen waren 44 Stämme von Schweinen isoliert worden, 19 Stämme sogar von Schweinen, die an ED oder Diarrhö erkrankt waren. Aus der Publikation geht aber nicht hervor, ob es Unterschiede in Abhängigkeit vom Nachweis anderer Virulenzgene gab. Imberechts *et al.* (1994) überprüften bei 50 *stx*<sub>2e</sub>-positiven Isolaten der O-Typen O139, O141 und O149 von 4 bis 12 Wochen alten Schweinen zwar das Vorkommen von Stx2e im Kulturüberstand qualitativ mit einem Verozell-Zytotoxizitätstest. Die Quantifizierung der Stx2e-Menge wurde aber nicht vorgenommen

### 5.3 Stx2e-Bildung und/oder -Freisetzung bei porcinen STEC-2e-Stämmen nach UV-Exposition oder unter der Einwirkung von Mitomycin C oder therapierelevanten Antiinfektiva

#### Festlegen einer Wirkstoffdosis für Antiinfektiva

Bevor die 30 ausgewählten STEC-2e-Feldstämme darauf geprüft werden konnten, ob sie sich durch Antiinfektiva zur Bildung von (mehr) Stx2e stimulieren ließen, musste zunächst die für jeden STEC-2e-Stamm individuell geeignete Wirkstoffdosis ermittelt werden. Andere Untersucher, die dieser Fragestellung nachgegangen waren, hatten die fraglichen Wirkstoffe in jeweils „subinhibitorischer Dosis“ eingesetzt (Karch *et al.* 1986, Walterspiel *et al.* 1992, Grif *et al.* 1998, Matsushiro *et al.* 1999, Köhler *et al.* 2000). Dabei findet man in der Literatur durchaus unterschiedliche Angaben darüber, welche Dosis als subinhibitorisch gilt (Grif *et al.* 1998, Matsushiro *et al.* 1999, Köhler *et al.* 2000, Uemura *et al.* 2004). In den eigenen Untersuchungen sollten diejenigen Versuchsparameter (v.a. Wirkstoffdosis und Einwirkdauer) als geeignet gelten, die bei möglichst vielen der 30 STEC-2e-Stämme einen messbaren Effekt auf die Stx2e-Freisetzung erzielten. Um diese Parameter zu bestimmen, wurden zunächst orientierende Versuche mit verschiedenen Mengen von Mitomycin C und Enrofloxacin an 5 STEC-2e-Feldstämmen sowie den zwei humanen STEC-Kontrollstämmen EDL 933 und 2771/97 unternommen. Die Kulturüberstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Behandlung gewonnen und deren Stx2e-Gehalt (bzw. Stx2a bei EDL 933) im ELISA bestimmt (siehe **Kapitel 4.4.2.3, Abbildung 18 bis Abbildung 21**). Da bei allen fünf Stämmen sowohl bei Mitomycin C als auch bei Enrofloxacin die höchsten Stx2e-Titer nach fünfstündiger Wirkstoffexposition nachweisbar waren, wurde diese Zeitspanne einheitlich für alle weiteren Stimulationsversuche gewählt. Außerdem wurde die Wirkstoffdosis für alle Wirkstoffe in Form der Wirkstoffendkonzentration im jeweiligen Testansatz (Endkonzentration, *f. c.*, in  $\mu\text{g/ml}$ ) angegeben und an der stammspezifischen, minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Antiinfektiva ausgerichtet. Diese Vorgehensweise sollte für jedes Antiinfektivum die gleichen Versuchsbedingungen schaffen. Die MHK wurde aus diesem Grund für alle eingesetzten Antiinfektiva und alle 30 Stämme mit der Bouillon-Mikrodilutionsmethode nach CLSI-Vorschrift bestimmt. Für die Stimulationsversuche wurde exakt die MHK (100 %-ige MHK) als Dosis gewählt, nachdem Mitomycin C in dieser Dosis bei den meisten Stämmen die höchsten Stx2a- bzw. Stx2e-Titer in den Kulturüberständen induzierte. Enrofloxacin induzierte in Konzentrationen, die größer als seine MHK waren, zwar höhere Stx-Titer als in derjenigen Konzentration, die genau der MHK entsprach, aber auch in 100 %-iger MHK wurde ein Stx2e-freisetzender Stamm bereits als solcher erkannt. Die Angaben zur Endkonzentration von MMC in ähnlichen Versuchen variieren in der Literatur zwischen 0,05 und 150  $\mu\text{g/ml}$  (Köhler *et al.* 2000, Muniesa *et al.* 2000, Ritchie *et al.* 2003,

Dutta *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2005, Beutin *et al.* 2008, Łoś *et al.* 2010, Granobles Velandia *et al.* 2012). Außer bei Dutta *et al.* (2004) ging den eingesetzten MMC-Konzentrationen dabei keine MHK-Bestimmung für MMC voraus. In der genannten Untersuchung legte man die Dosis auf 150 µg/ml fest, was der  $MHK_{50}$  der untersuchten Stämme entsprach. Enrofloxacin ist von den verschiedenen Untersuchern ebenfalls in einer recht großen Spannbreite an Endkonzentrationen eingesetzt worden, um seine Wirkung auf die Stx-Bildung zu untersuchen. Dabei wurde zwar stets eine MHK-Bestimmung durchgeführt, diese wurde jedoch nicht immer als Richtwert für die Expositionsdosis benutzt. So bestimmten Maurer *et al.* (2008) zwar die MHK von Enrofloxacin bei 46 STEC-Stämmen mit dem Etest®, legten die Expositionsdosis aber einheitlich bei 0,25 µg/ml (*f. c.*) fest, nachdem diese Dosis in den Wachstumskurven von 2 Stämmen subinhibitorisch gewirkt hatte (Maurer *et al.* 2008). In einer weiteren Studie von Maurer *et al.* (2009) wurde Enrofloxacin in folgender Dosierung (*f. c.*) bei zuvor selektierten, Enrofloxacin-resistenten *E. coli*-Mutanten verwendet: 0,13 µg/ml, 0,15 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,75 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml. Bei den drei letztgenannten Konzentrationen nahm man an, dass sie die MHK überschritten. Uemura *et al.* (2004) setzten den EDEC-Stamm MVH 269 versuchsweise dem Enrofloxacin in der Endkonzentration von 0,125 µg/ml (100 % MHK) und von 6,25 µg/ml (5.000 % MHK) aus. Der Stamm reagierte darauf jedoch nicht mit einem Anstieg der Stx2e-Bildung oder -Freisetzung (Uemura *et al.* 2004).

Die in den eigenen Versuchen zur Festlegung einer Wirkstoffdosis verwendeten Endkonzentrationen von MMC (0,03 bis 4 µg/ml) deckten in etwa den Bereich ab, in dem auch die von anderen Untersuchern verwendeten Konzentrationen lagen. Lediglich Dutta *et al.* (2004) verwendeten eine bis zu 38-fach höhere Konzentration. Die Endkonzentrationen von Enrofloxacin (0,001 bis 0,03 µg/ml), waren dagegen geringer als in der Literatur angegeben. Dies lag daran, dass in der Dissertation die Expositionsdosis strikt an der MHK ausgerichtet wurde, die Enrofloxacin-MHK bei allen Stämmen aber sehr niedrig war (0,008 bis 0,25 µg/ml).

### **Minimale Hemmkonzentrationen gegenüber den STEC-2e-Feldstämmen vom Schwein**

Die MHK-Bestimmung ergab unter anderem, dass alle 30 ausgewählten Stämme resistent gegen Erythromycin waren. Dies überrascht nicht, da *E. coli* eine natürliche Resistenz gegenüber Makroliden besitzt (Kroker 2003). Allerdings wird das Makrolid Tylosin in der Schweineproduktion häufig gegen *Lawsonia intracellularis*, den Erreger der porcinen Ileitis, und *Brachyspira hyodysenteriae*, den Erreger der Schweinedysenterie, eingesetzt. Erythromycin wurde statt Tylosin in die MHK-Bestimmung und Expositionsversuche einbezogen, da es die vom Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ der DVG empfohlene Stell-



vertretersubstanz der Makrolide ist und für Erythromycin, anders als für Tylosin, ein *breakpoint* vom CLSI formuliert wurde (CLSI 2002, Luhofer *et al.* 2004, DVG 2006).

In der Geflügel- und Schweinehaltung kommen in Deutschland häufig Antibiotika zum Einsatz, wobei Tetrazykline unter den Grundsubstanzen, die an in Deutschland ansässige Tierärzte/Tierärztinnen abgegeben werden, den größten Anteil einnehmen (566 t im Jahr 2012, BVL *et al.* (2014)). Die relativ hohen Verbrauchsmengen korrelieren mit hohen Tetrazyklin-Resistenzquoten bei mehreren bakteriellen Krankheitserregern, die bereits seit vielen Jahren und nicht nur in Deutschland beobachtet werden (Dayao *et al.* 2014, de Jong *et al.* 2014, Li *et al.* 2014, Tamang *et al.* 2014). Dennoch überrascht es zunächst, dass in der vorliegenden Untersuchung 70 % der 30 ausgewählten STEC-2e-Feldisolate gegen Tetrazyklin resistent reagierten. Diese Größenordnung entspricht allerdings recht gut den im Rahmen der GERM-Vet-Studie 2004/2005 für die Indikation „Enteritis“ beim Schwein ermittelten Werten, in der 76 % der 492 untersuchten *E. coli*-Stämme Tetrazyklin-resistent waren (BVL *et al.* 2008). Ähnliche Zahlen lieferte auch die GERM-Vet-Studie des Jahres 2010, in welcher die Resistenzquoten für Tetrazyklin bei insgesamt 237 *E. coli*-Isolaten, abhängig von der Produktionsstufe, zwischen 60 und 79 % betrugen (BVL *et al.* 2014). In den USA und in Vietnam ermittelte man unter *E. coli*-Isolaten vom Schwein sogar Tetrazyklin-Resistenzquoten zwischen 95,4 % und 100 % (Fratamico *et al.* 2008, Oanh *et al.* 2010).

Günstiger stellte sich die Situation bei Enrofloxacin dar. Da es für diesen Wirkstoff keine schweinespezifischen CLSI-Grenzwerte gab, fanden die Grenzwerte des „Arbeitskreises Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik“ (AVID) Anwendung, um die ermittelten MHK-Werte zu beurteilen (AVID 2000). Dabei zeigten sich alle 30 Isolate gegenüber Enrofloxacin als sensibel. Sowohl der MHK<sub>50</sub>- als auch der MHK<sub>90</sub>-Wert war mit 0,008 µg/ml bzw. 0,06 µg/ml sehr niedrig. Die beim GERM-Vet-Monitoring für Enrofloxacin ermittelte MHK<sub>90</sub> lag in den Messzeiträumen 2004/2005, 2006/2007 und 2010 anhaltend bei ebenfalls niedrigen 0,5 µg/ml (BVL *et al.* 2014). In dieses Bild passt auch der Befund, dass die Enrofloxacin-MHK bei dem klinischen ED-Isolat MVH 269 0,125 µg/ml betrug (Uemura *et al.* 2004). Mit seinen niedrigen MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werten hebt sich Deutschland von einigen anderen Ländern deutlich ab. So werden aus Korea, Vietnam und Spanien Enrofloxacin-Resistenzquoten von 31 % bis 61 % bei porcinen enterischen *E. coli*-Isolaten berichtet (Mateu und Martin 2000, Choi *et al.* 2002, Oanh *et al.* 2010). Dementsprechend wurden in der Studie von Choi *et al.* (2002) MHK<sub>90</sub>-Werte zwischen 16 und 32 µg/ml gemessen. Diese relativ hohen Werte sind vermutlich durch den frequenten Einsatz dieses Fluorchinolons in den genannten Ländern zu erklären. In Deutschland betrug der Anteil von Fluorchinolonen am Gesamt-Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin in den Jahren 2011 und 2012 im

Mittel nur 0,5 % und ist damit in den vergangenen zehn Jahren konstant niedrig (BVL *et al.* 2014).

Die Häufigkeit der Amoxicillin-MHK-Werte zeigte unter den 30 geprüften Feldstämmen eine zweigipfelige Verteilung mit einer sensibleren und einer weniger sensiblen Gruppe an Stämmen. Eine ähnlich weite Streuung wurde auch von Uemura *et al.* (2003) bei porcinen ED-*E. coli*-Isolaten beobachtet, hier traten MHK-Werte zwischen 3 und über 100 µg/ml auf (Uemura *et al.* 2003). Bei porcinen STEC in Korea lag der Anteil Amoxicillin-resistenter Isolate mit 49,8 % (Choi *et al.* 2002) fast genauso hoch wie bei den STEC-2e-Stämmen in der hier vorgelegten Arbeit (50 %). In den GERM-Vet-Studien der Jahre 2004/2005, 2006/2007 und 2010 wurde Amoxicillin nicht untersucht. Daher liegen zu diesem Wirkstoff keine Vergleichsdaten vor. Eine mögliche Erklärung für die relativ hohe Quote an wenig sensiblen *E. coli*-Stämmen beim Schwein bietet der seit 2003 vermehrte Einsatz von Amoxicillinpräparaten bei Tieren in Deutschland (BVL *et al.* 2008). Auch 2011 waren die Aminopenicilline mit 528 t nach den Tetrazyklinen die am zweithäufigsten an deutsche Tierärzte/Tierärztinnen abgegebenen antimikrobiellen Wirkstoffe (BVL *et al.* 2014).

Laut BVL *et al.* (2008) ist bei Neomycin mit einer eingeschränkten Wirksamkeit zu rechnen, da für Aminoglykoside einschließlich Neomycin bei enterischen *E. coli* vom Schwein hohe  $MHK_{90}$ -Werte (16 - 512 µg/ml) ermittelt wurden (BVL *et al.* 2008). Die  $MHK_{90}$ -Werte der Aminoglykoside Apramycin und Spectinomycin, die für solche *E. coli*-Isolate der Jahre 2006/2007 bzw. 2010 bestimmt wurden, waren unverändert hoch oder lagen sogar höher (32 bis  $\geq 64$  µg/ml bzw.  $\geq 512$  µg/ml, BVL *et al.* (2014)). Neomycin wurde im Rahmen von GERM-Vet in diesen Jahren nicht mehr untersucht. Der im Rahmen der Dissertation ermittelte  $MHK_{90}$ -Wert von 64 µg/ml bei Neomycin ist kongruent mit den in der GERM-Vet-Studie erhobenen Daten (BVL *et al.* 2008).

Aus den Daten des GERMAP 2008-Berichtes, welche sich auf *E. coli*-Isolate aus der GERM-Vet-Studie 2004/2005 stützten, konnte bei Colistin für die Indikation „Enteritis“ aufgrund der niedrigen  $MHK_{90}$  (0,5 µg/ml) noch auf eine ausreichende Wirksamkeit geschlossen werden (BVL *et al.* 2008). Mittlerweile muss jedoch von einer geringeren Colistin-Empfindlichkeit ausgegangen werden. So betrugen die  $MHK_{90}$ -Werte dieses Wirkstoffes bei *E. coli*-Stämmen von Ferkeln mit Enteritis in den Jahren 2006/2007 bzw. 2010 4 bzw. 8 µg/ml (BVL *et al.* 2014). Der in der hier vorgelegten Arbeit ermittelte Colistin-MHK<sub>90</sub>-Wert von 8 µg/ml bestätigt diese Beobachtung.

In den Dokumenten von AVID, CLSI und EUCAST existieren keine Grenzwerte für MMC (AVID 2000, CLSI 2002, EUCAST 2013, CLSI 2015). Außerdem existieren in der Fachliteratur keine Angaben zu MMC-MHK-Werten gegenüber *E. coli*-Bakterien. Zwar ist MMC

ein Antibiotikum, welches aus *Streptomyces caespitosus* gewonnen wird (Verweij und Pinedo 1990). Aufgrund seines Einsatzes als Zytostatikum wird seine Wirksamkeit aber durch die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) bewertet, welche diejenige Konzentration eines Inhibitors bezeichnet, bei der eine halbmaximale Wachstumsinhibition der Tumorzellen beobachtet wird (Nevo-Koch 2010).

### Reproduzierbarkeit der Messwerte im Stx2e-ELISA

Ein methodisch wichtiger Aspekt war die Festlegung von Grenzwerten, bei deren Überschreitung eine Zunahme der Stx2e-Konzentration als post-expositionell gesteigerte Stx2e-Freisetzung gewertet werden sollte. Dies wurde dadurch erschwert, dass die einzelnen Stämme schon bezüglich der Stx2e-Freisetzung unter Standardanzuchtbedingungen ein hohes Maß an Variabilität zeigten. Eine solche Variabilität unter STEC-Stämmen ist bereits aus Versuchen bekannt, in denen die Stx-Menge zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurde (Downes *et al.* 1989). Sie war als eine mögliche Fehlerquelle ebenso zu berücksichtigen wie methodisch bedingte Variationen der Stx2e-Messwerte.

Die eigenen Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit, die an den drei STEC-2e-Feldstämmen P868/02, 1912/04 und P283/01 und den beiden Kontrollstämmen 2771/97 sowie 987P durchgeführt wurden, haben für drei der fünf Stämme (P868/02, 1912/04 und 987P) eine hinreichende bis gute Reproduzierbarkeit der Messwerte ergeben, für zwei Stämme war diese jedoch weniger zufriedenstellend (P283/01 und 2771/97, siehe **Kapitel 4.4.2.3**). Bei dem Isolat P283/01 waren die hohen Variationskoeffizienten von 39 % und 76 % auf ungewöhnlich niedrige Messwerte am ersten Versuchstag zurückzuführen. Die Ursache für diese Ausreißer konnte leider nicht geklärt werden. Die Variationskoeffizienten von 23 % und 25 % bei dem Stamm 2771/97 hingen dagegen vermutlich mit den hier stets hohen Stx2e-Konzentrationen zusammen. Die Erfahrung zeigte, dass die Messwerte in dem etablierten Stx2e-ELISA bei Mehrfachansätzen oder wiederholten Messungen hin und wieder um eine  $\log_2$ -Stufe voneinander abwichen, so wie es auch bei dem Stamm 2771/97 beobachtet wurde. Ein Unterschied von einer  $\log_2$ -Stufe resultiert dann in einer annähernden Verdoppelung bzw. Halbierung des  $n\log$ -Stx2e-Titers.

Das Auftreten großer Variationskoeffizienten (VK) musste berücksichtigt werden, wenn ein Stamm hinsichtlich seiner Stimulierbarkeit beurteilt werden sollte. Bei den Expositionsversuchen wurde ein Stx2e-Anstieg über 110 % bzw. ein Abfall unter 90 % desjenigen Wertes, der in der nicht behandelten Kultur gemessen wurde, als Zu- bzw. Abnahme interpretiert. Die Stx2e-Menge von Stämmen mit einem VK bis 10 % würde somit nicht fälschlich als vermehrt oder vermindert bewertet. Allerdings könnten bei Stämmen mit einem VK über 10 % geringe Zu- oder Abnahmen ihrer Stx2e-Konzentration als Stimulation bzw. Hemmung der

Stx2e-Freisetzung missdeutet werden. Die Ermittlung der VK für jeden einzelnen der 30 Stämme mit sowie ohne eine Behandlung wäre jedoch sehr aufwändig gewesen. Daher wurden - nach exemplarischer Bestimmung der VK für 3 Feld- und 2 Kontrollstämmen (siehe **Tabelle 24**) - die Grenzwerte zwecks Beurteilung der Zu- bzw. Abnahme der Stx2e-Konzentration näherungsweise für einen VK von 10 % angenommen. Eine Zu- oder Abnahme der Stx2e-Konzentration nach einer Behandlung wurde in der Dissertation als Vielfaches der Konzentration im Vergleichsansatz ausgedrückt. Diese Form der Angabe ist in Bezug auf Stx-Mengen und -Konzentrationen durchaus üblich (Ritchie *et al.* 2003, Lejeune *et al.* 2004, Mohsin *et al.* 2010). Teilweise wurde aber erst eine mindestens 10-fache Zunahme der Stx-Konzentration als Induktion bewertet (Ritchie *et al.* 2003). Dabei ist aber zu beachten, dass die Stx-Bildung der bovinen und humanen Stämme in der genannten Studie von Ritchie *et al.* (2003) um ein Vielfaches höher lag als die der porcinen STEC-2e in dieser Dissertation. Einige Untersucher nutzten lediglich die nicht weiter normalisierten Messwerte (OD-Werte) bzw. das Verhältnis der Messwerte von behandelten und nicht behandelten Bakterien, um die Stimulierbarkeit bzw. Induzierbarkeit eines Stammes zu beurteilen (Lejeune *et al.* 2004, Beutin *et al.* 2008). Im Vergleich dazu ergab in der vorliegenden Dissertation die Kombination aus dem hohen ELISA-Cut-Off, der Normalisierung der OD-Werte als nlog-Stx2e-Titer und der Verwendung der 90 %- und 110 %-Marke ein recht vorsichtiges Bewertungssystem hinsichtlich der Stimulierbarkeit eines STEC-2e-Stammes.

### **Einfluss von Mitomycin C, UV-Licht und Antiinfektiva auf die Stx2e-Bildung und/-Freisetzung von porcinen STEC-2e-Stämmen**

Anders als bei der Untersuchung der Stx2e-Bildung unter Standardanzuchtbedingungen wurden bei den Versuchen, bei denen eine Behandlung mit Mitomycin C, UV-Licht oder Antiinfektiva durchgeführt wurde, nur die Kulturüberstände, nicht aber die zellassoziierten Fraktionen, auf ihren Stx2e-Gehalt untersucht. Dieser Vorgehensweise lag die Überlegung zugrunde, dass in der Pathogenese der ED hauptsächlich dasjenige Stx2e von Bedeutung ist, das von den EDEC- und EDEC/ETEC-Bakterien in das Darmlumen des Schweines abgegeben wird. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass der Anstieg der Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand die Folge der gesteigerten Stx2e-Biosynthese oder der verstärkten Freisetzung von periplasmatisch gespeichertem Stx2e sein kann oder das Ergebnis einer Kombination aus beiden Prozessen darstellt.

Die Untersuchung der 30 ausgewählten STEC-2e-Feldstämmen ergab, dass die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand bei einigen Stämmen nach einer Behandlung mit den klassischen Phagen-induzierenden Faktoren MMC oder UV-Licht oder nach der Koinkubation mit dem einen oder anderen geprüften Antiinfektivum tatsächlich größer war als ohne diese Be-

handlung. Insgesamt unterschieden sich die Stämme in ihren Reaktionen auf die exogenen Einflussfaktoren sehr stark voneinander. Auffällig war, dass ein gewisser Zusammenhang mit der vorhandenen Virulenzgenkombination bzw. mit der Klassifikation als EDEC, EDEC/STEC und sonstige STEC-2e bestand. So waren alle sechs Stämme, deren Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand nach Behandlung mit MMC und/oder UV-Licht angestiegen war, als EDEC klassifiziert. Bei EDEC-Stämmen war die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand nach Standardanzucht sehr niedrig gewesen und das meiste Stx2e in den Bakterienzellen lokalisiert (siehe **Abbildung 11**). Daher könnte es sich bei dem beobachteten Anstieg der Stx2e-Konzentration in den Kulturüberständen rein um eine durch die jeweilige Behandlung verstärkte Abgabe des in der Bakterienzelle gespeicherten Stx2e gehandelt haben. Die Stx2e-Konzentration [nlog-Stx2e-Titer] in den Kulturüberständen lag jedoch bei einigen stimulierbaren Stämmen (P868/02, P5413/04-1, P8615/00-1 und P4663/02) um ein Vielfaches höher als diejenige, die unter Standardanzuchtbedingungen in den Bakterienzellen des jeweiligen Stammes nachgewiesen worden war. Bei solchen Stämmen kann die Behandlung nicht nur die Freisetzung verstärkt haben, sondern muss auch die Proteinbiosynthese von Stx2e angekurbelt haben.

Auf die Einwirkung von Antiinfektiva reagierten insgesamt nur 7 der 30 Stämme mit einem Anstieg der Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand (siehe **Tabelle 22**). Drei von diesen Stämmen gehörten dem Pathovar EDEC/ETEC an (P2164/01-3, P8615/00-1 und P4663/02), wobei zwei Stämme auf die Antiinfektiva überhaupt am stärksten reagierten (10,5-facher Anstieg der Stx2e-Konzentration bei P4663/02 und 16,9-facher Anstieg bei P8615/00-1). Da nach Standardanzucht die Stx2e-Konzentration in der Bakterienzelle und auch die Stx2e-Gesamtmenge bei den Stämmen aus der EDEC/ETEC-Gruppe im Mittel am niedrigsten waren (siehe **Abbildung 11**), ist auch aus diesen Daten abzuleiten, dass der Antiinfektiva-induzierte Stx2e-Anstieg im Kulturüberstand bei diesen Stämmen nicht nur auf der vermehrten Freisetzung von präformiertem Stx2e aus dem periplasmatischen Raum beruhte, sondern auch auf der verstärkten Stx2e-Biosynthese. Die Untersuchungen anderer Autoren haben bereits belegt, dass ein phänotypisch registrierter Anstieg von Stx2e von erhöhten Spiegeln an *stx*<sub>2e</sub>-spezifischer mRNA begleitet war und demnach durch die verstärkte *stx*<sub>2e</sub>-Genexpression zustande kam. So konnten Beutin *et al.* (2008) für STEC-2e-Stämme zeigen, dass die Menge an *stxA*<sub>2e</sub>-spezifischer mRNA in STEC-2e mit der phänotypisch im Enzym-Assay nachgewiesenen Stx2e-Menge korrelierte (Beutin *et al.* 2008). Auch Zhang *et al.* (2005) beschrieben signifikant höhere Level an *stx*<sub>2e</sub>-spezifischer mRNA in STEC-Stämmen, in deren Kulturüberstand Stx2e detektiert werden konnte (sog. Sezernierer) als in Stämmen, deren Kulturüberstände auf Stx2e negativ getestet worden waren (Zhang *et al.* 2005).

Das Antiinfektivum mit dem stärksten Einfluss auf die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand der porcinen STEC-2e-Feldstämme war Enrofloxacin. Der Wirkstoff führte bei 6 der 30 Stämme zum Konzentrationsanstieg, zudem war die Stimulierbarkeit nach einer Behandlung mit Enrofloxacin signifikant stärker als nach der Behandlung mit Tetracyclin, Erythromycin oder einer UV-Bestrahlung (einfaktorielle ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test,  $p < 0,01$ ). Diese Beobachtung deckt sich mit den publizierten Beobachtungen vieler anderer Untersucher, die Chinolonantibiotika, speziell Fluorchinolone, als potente Stimulatoren der Stx-Bildung bei STEC und hier vor allem bei EHEC beschrieben (Walterspiel *et al.* 1992, Kimmitt *et al.* 1999, Matsushiro *et al.* 1999, Yoh *et al.* 1999, Kimmitt *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2000). Fluorchinolone sind als Induktoren der bakteriellen SOS-Antwort bekannt (Kimmitt *et al.* 1999, Kimmitt *et al.* 2000). Als wesentlicher Wirkmechanismus wird deshalb angenommen, dass Enrofloxacin über die Provokation der bakteriellen SOS-Antwort den lytischen Replikationszyklus temperenter Bakteriophagen anstößt und dabei auch die phagenregulierten Stx-Gene aktiviert (Kimmitt *et al.* 1999, Kimmitt *et al.* 2000). Gezielte Untersuchungen an STEC-2e sind bisher allerdings rar. In der einzigen Studie, welche die Auswirkung von Enrofloxacin auf die Stx2e-Bildung und/oder -Freisetzung bei einem klinischen ED-Isolat (*E. coli* MVH 269) beschreibt, führte Enrofloxacin jedoch, sowohl in einer Dosis, welche der einfachen MHK entsprach, als auch in der 50-fach höheren Dosis zur signifikanten Abnahme von Stx2e im USL-Überstand, während die Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand unbeeinflusst blieb (Uemura *et al.* 2004). Auch in der vorliegenden Dissertation blieb die Stx2e-Menge im Kulturüberstand bei 7 von 30 untersuchten Stämmen nach der Enrofloxacin-Behandlung unverändert und nahm bei 14 Stämmen sogar ab. Dies zeigt zunächst, dass die Regulation der Stx2e-Genexpression bei der Mehrzahl der STEC-2e-Stämme nicht oder nicht mehr mit der SOS-Antwort gekoppelt zu sein scheint. Laut Fachinformation (Stand 01.08.2007, abrufbar beim Veterinärmedizinischen Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht unter [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de), Emmerich (2013)) wird für das Handelspräparat „Baytril® 0,5 % Lösung zum Eingeben für Schweine (Ferkel)“ der Bayer Vital GmbH, Leverkusen zur Anwendung beim Schwein eine Dosis von 1,7 mg/kg KGW empfohlen. Diese Dosis überschreitet im Prinzip die Enrofloxacin-MHK der untersuchten STEC-2e-Stämme. Da Enrofloxacin *in vitro* bei einer Dosis, die der MHK entsprach (100 % MHK), zu einem Anstieg des freien Stx2e geführt hatte, erscheint es möglich, dass die vorschriftsmäßige Applikation von Enrofloxacin im Einzelfall auch *in vivo* die Stx2e-Freisetzung verstärkt. Die erzielten Ergebnisse machen allerdings deutlich, dass man aus der Reaktion einzelner STEC-Isolate keine zutreffenden Aussagen über die Reaktivität aller anderen Vertreter dieses Pathovars ableiten kann. Folglich sind im konkreten Fall gezielte, stammspezifische

Untersuchungen erforderlich, um das Risiko der Antiinfektiva-induzierten Stx-Bildung und/oder -Freisetzung *in vivo* abschätzen zu können.

Außer Enrofloxacin führten auch Amoxicillin und Neomycin zum Anstieg der Stx<sub>2e</sub>-Konzentration im Kulturüberstand, allerdings nur bei insgesamt 3 STEC-2e-Feldstämmen. Darunter befand sich auch ein Stamm, der nicht durch MMC, UV-Licht oder Enrofloxacin aktiviert worden war. Für Amoxicillin haben bereits andere Untersucher Ergebnisse publiziert. So stimulierte Amoxicillin in einer Dosis, die der MHK entsprach, die Stx<sub>2</sub>-Proteinbiosynthese bei einem O157:H7-EHEC-Stamm, wenn der Stamm bei 37 °C und (mikro-) aerob angezüchtet wurde. Bei  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie Amoxicillin vermuteten die Autoren deshalb einen von der bakteriellen SOS-Antwort unabhängigen Induktionsmechanismus (Kimmitt *et al.* 2000). Für diese Untersuchungen war das chromosomale *stxA<sub>2</sub>*-Gen des Stammes mit dem Reportergen *lacZ* fusioniert worden (Kimmitt *et al.* 2000). Nach neueren Erkenntnissen können aber auch  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bei *E. coli* die SOS-Antwort auslösen (Miller *et al.* 2004). Da die Reaktionen der STEC-2e-Stämme auf Enrofloxacin, MMC und Amoxicillin nicht deckungsgleich waren, ist zu vermuten, dass bei ihnen sowohl der SOS-Mechanismus als auch ein noch unbekannter, weiterer Induktionsmechanismus in Betrieb ist. Auffällig war allerdings auch, dass gerade die bakterizid wirkenden Antiinfektiva Amoxicillin und Neomycin zu einem Anstieg von Stx<sub>2e</sub> im Kulturüberstand führten. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass dieser Stx<sub>2e</sub>-Konzentrationsanstieg allein darauf beruhte, dass zellassoziiertes Stx<sub>2e</sub> aus den abgetöteten Bakterienzellen freigesetzt wurde. Zu einer derartigen Interpretation gelangten jedenfalls Uemura *et al.* (2004), nachdem sie beobachtet hatten, dass die Stx<sub>2e</sub>-Konzentration bei ihrem EDEC-Isolat MVH 269 unter der Einwirkung von Ampicillin im Kulturüberstand anstieg, gleichzeitig aber die Menge an zellassoziertem Stx<sub>2e</sub> (Stx<sub>2e</sub> im USL-Überstand) abnahm ((Uemura *et al.* 2004).

Bei dem Großteil der hier untersuchten Stämme (25 von 30) nahm die Stx<sub>2e</sub>-Konzentration nach der Behandlung mit Colistin ab oder blieb unverändert. Eine ähnliche Reaktion auf die Colistin-Exposition beschrieben auch Uemura *et al.* (2004). In Deutschland sind 22 Colistin-haltige Präparate für die Anwendung beim Schwein zugelassen und verkehrsfähig (Stand 01/2015), wovon 19 Präparate zur Applikation *per os* bzw. zur Herstellung von Fütterungsarzneimitteln vorgesehen sind ([www.vetidata.de](http://www.vetidata.de), (Emmerich 2013)). Nach den hier erzielten Ergebnissen scheint man beim Einsatz von Colistin bei STEC-infizierten Schweinen die Gefahr der verstärkten Stx<sub>2e</sub>-Anflutung im Darm zunächst nicht befürchten zu müssen. Allerdings ist zu bedenken, dass Colistin bakterizid wirkt (Kroker 2003). Bei hohen EDEC-Keimzahlen im Darm könnte Colistin zu einer abrupten Freisetzung von viel präformiertem Stx<sub>2e</sub> führen. Eine solcher Pathomechanismus wird jedenfalls von Konstantinova *et al.* (2008) postuliert. Sie beobachteten nämlich eine signifikant höhere Morbidität bei parenteral mit

Colistin behandelten Ferkeln als bei unbehandelten Tieren, die anschließend mit einem EDEC-Stamm infiziert worden waren. Es dürfte dabei vom Prinzip her unerheblich sein, ob eine Freisetzung von Stx2e aus den EDEC-Bakterien erst in den mesenterialen Lymphknoten erfolgt, wie es Konstantinova *et al.* (2008) annahmen, oder ob das Stx2e im Darm freigesetzt wird. Colistin kann an beiden Stellen auf die Bakterien einwirken, da sowohl die parenterale Applikation (Wirkung im Lymphknoten) als auch die orale Applikation (Wirkung im Darm) von Colistin zulässig sind. Die meisten Forscher sind allerdings der Ansicht, dass im Zuge der ED-Pathogenese das Stx2e bereits im Darm frei wird (Imberechts *et al.* 1992, Bertschinger und Gyles 1994, Waddell *et al.* 1996, Mainil 1999, Moxley 2000).

Auf die Behandlung mit Erythromycin reagierten 29 von 30 Stämmen entweder mit einer Abnahme von Stx2e im Kulturüberstand oder der Gehalt an Stx2e blieb unbeeinflusst. Die Angaben in der Literatur bezüglich der Auswirkung von Erythromycin und anderen Makroliden auf die Stx-Produktion und -Freisetzung sind widersprüchlich. Einige Stämme reagierten mit einem Anstieg von Stx1 bzw. Stx2, andere dagegen mit einer Abnahme (Grif *et al.* 1998, Murakami *et al.* 2000, Morita *et al.* 2004). Unter den in der Literatur beschriebenen Stämmen war allerdings kein Stx2e-positives Isolat vertreten, so dass ein valider Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit bereits bekannten Daten nicht möglich ist. In jenen Studien waren einige Stämme ebenso resistent gegenüber Erythromycin wie die STEC-2e-Stämme der vorliegenden Dissertation (Grif *et al.* 1998). Der trotz der Makrolid-resistenz von *E. coli* auftretende stimulatorische Effekt von Erythromycin auf die Stx-Bildung konnte von den Autoren nicht erklärt werden. Auch bei Enrofloxacin wird von einer verstärkten Stx2-Bildung bei Stämmen berichtet, die gegenüber diesem Wirkstoff eigentlich resistent waren (Maurer *et al.* 2009). So scheint dieses Phänomen nicht unüblich zu sein.

Auch nach der Behandlung mit Tetrazyklin war die Menge an freigesetztem Stx2e bei allen 30 untersuchten STEC-2e-Stämmen reduziert oder blieb unbeeinflusst. Die Stx2e-Bildung bzw. -Freisetzung war sogar signifikant weniger stark stimulierbar als bei allen anderen Wirkstoffen (einfaktorielle ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test,  $p < 0,05$ ). In der Fachliteratur findet man nur Angaben zur Auswirkung von Tetrazyklin auf die Stx1-Bildung und/oder -Freisetzung bei humanen EHEC-Stämmen (Walterspiel *et al.* 1992). Dort stieg der Stx1-Gehalt bei 4 bzw. 3 von 5 geprüften Stämmen nach der Behandlung mit Tetrazyklin an, bei den restlichen Stämmen nahm er ab. Vermutlich sind die Bildung und die Freisetzung der beiden Stx-Typen bzw. -Subtypen unterschiedlich reguliert. Die Abnahme von Stx2e in der vorliegenden Untersuchung könnte durch den bakteriostatischen Effekt bzw. die Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese (Kroker 2003) durch Tetrazyklin bedingt sein.

Vergleicht man die Ergebnisse, die mit den klassischen Phagen-induzierenden Faktoren MMC und UV erzielt wurden, mit den Antiinfektiva-Resultaten, dann fällt auf, dass MMC



und/oder UV-Licht die Stx<sub>2e</sub>-Freisetzung bei ähnlich vielen Stämmen ankurbelten wie Antiinfektiva (6 Isolate versus 7 Isolate). Auffällig war jedoch, dass die MMC- und/oder UV-Exposition deutlich stärkere Anstiege der Stx<sub>2e</sub>-Konzentrationen induzierte als die Einwirkung der Antiinfektiva. Ferner fällt auf, dass in 15 von 18 Testansätzen (83 %), bei denen es zur Stimulation der Stx<sub>2e</sub>-Bildung und/oder -Freisetzung kam, Noxen eingesetzt worden waren, welche bekanntermaßen DNS-schädigend wirken (vgl. **Tabelle 22**; Stx<sub>2e</sub>-Konzentration im Überstand der behandelten Kultur beträgt mehr als 110 % der Konzentration im Überstand der nicht behandelten Kultur bei gleichzeitigem Anstieg der Stx<sub>2e</sub>-Konzentration über den Stx<sub>2e</sub>-ELISA-Cut-Off). So interkaliert das Alkylans MMC in die DNS, fördert UV-Licht die Ausbildung von Pyrimidin-Dimeren und verhindern Gyrasehemmer wie Enrofloxacin den Verschluss der eingeführten Einzelstrangbrüche in der bakteriellen DNS (Lown *et al.* 1976, Verweij und Pinedo 1990, Drlica und Zhao 1997, Rastogi *et al.* 2010). Dies deutet daraufhin, dass ähnlich wie in anderen STEC (Mühldorfer *et al.* 1996, Kimmitt *et al.* 1999, Kimmitt *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2000, Schmidt 2001, Ritchie *et al.* 2003, Herold *et al.* 2004, Maurer *et al.* 2008) auch in vielen porcinen STEC-2e die SOS-Antwort auf DNS-Schäden einer der wichtigsten Aktivatoren der Stx<sub>2e</sub>-Bildung und/oder -Freisetzung ist. Da 12 der oben genannten 15 Testansätze bei den untersuchten EDEC-Stämmen zu beobachten waren, muss man annehmen, dass dieses Regulationsprinzip bei typischen EDEC gehäuft vorkommt, wenn auch selbst dort nicht bei allen Stämmen.

Die im Zuge der bakteriellen SOS-Antwort gesteigerte Biosynthese und Abgabe von Stx aus der STEC-Bakterienzelle ist eng verknüpft mit der Aktivierung von Stx-kodierenden, lambdoiden Prophagen, da es hierbei zur Proteolyse des Phagen-Repressors CI kommt (Little und Mount 1982, Roca und Cox 1997, Rozanov *et al.* 1998, Wagner *et al.* 1999, Koudelka *et al.* 2004, Livny und Friedman 2004, Tyler *et al.* 2004, Waldor und Friedman 2005). Allerdings wurde bei STEC-2e-Stämmen vom Schwein bis heute kein intakter Stx<sub>2e</sub>-konvertierender Bakteriophage gefunden. Solche Phagen wurden bislang nur bei dem humanen *E. coli*-Stamm 2771/97 (Phage  $\phi$ P27) und aus dem Abwasser eines Schweineschlachtbetriebs isoliert (Muniesa *et al.* 2000, Imamovic *et al.* 2010a). Dass auch in der vorliegenden Arbeit ein derartiger Phage nicht gefunden werden konnte (siehe auch **Kapitel 5.4**), schließt jedoch nicht aus, dass doch wenigstens funktionsfähige Teilsequenzen *stx*<sub>2e</sub>-konvertierender Phagen in den hier untersuchten STEC-2e-Stämmen von Schweinen vorhanden und in die Regulation der *stx*<sub>2e</sub>-Expression involviert waren. Tatsächlich sind, in Analogie zu STEC- bzw. EHEC-Stämmen, mittlerweile aber auch bei mehreren dahingehend untersuchten porcinen STEC-2e-Stämmen Phagengene unmittelbar stromaufwärts und stromabwärts des *stx*<sub>2e</sub>-Operons nachgewiesen worden, u. a. auch  $\phi$ P27-homologe Gene (Recktenwald und Schmidt 2002, Beutin *et al.* 2008). In der Studie von Beutin *et al.* (2008)

wurde mittels PCR mindestens eine von vier gesuchten  $\phi$ P27-spezifischen Gensequenzen bei immerhin 109 der 110 untersuchten STEC-2e-Stämme nachgewiesen, darunter auch bei 43 von 44 in jene Untersuchung einbezogenen STEC-2e-Isolaten von Schweinen (Beutin *et al.* 2008). Entgegen früherer Annahmen ist deshalb heute davon auszugehen, dass auch in allen Stx2e-kodierenden STEC-Stämmen das Shigatoxin-Operon Teil eines Prophagen ist. Jedoch scheint dieser Stx2e-kodierende Prophage bei den porcinen STEC-2e-Stämmen nicht mehr in einen vollständigen Replikationszyklus eintreten und intakte, infektiöse Phagenpartikel hervorbringen zu können (Recktenwald und Schmidt 2002, Beutin *et al.* 2008).

In der vorliegenden Studie spricht bei wenigstens vier STEC-2e-Stämmen (P868/02, P5413/04-1, P8615/00-1 und P4663/02) vieles dafür, dass die Faktor-assoziierte Erhöhung der Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand nicht nur durch eine vielleicht verstärkte Toxinfreisetzung verursacht war, sondern (auch) durch eine mit der bakteriellen SOS-Antwort gekoppelten Steigerung der Toxinsynthese. Die Stx2e-Konzentrationen der genannten Stämme waren nach Standardanzucht nämlich sowohl im Lysat- (P5413/04-1, P8615/00-1 und P4663/02) als auch im Kulturüberstand (P868/02, P5413/04-1, P8615/00-1 und P4663/02) sehr niedrig. Dagegen war nach der UV-Bestrahlung bzw. nach der Enrofloxacin- bzw. der MMC-Exposition in ihren Kulturüberständen soviel Stx2e vorhanden (43,6-fache bzw. 16,9-fache und 10,5-fache bzw. 47,3-fache Konzentration), dass diese Menge nicht einfach nur das zuvor im Periplasma gespeicherte Stx2e gewesen sein konnte. Bei anderen Stämmen der vorliegenden Arbeit deuten die Reaktionen dagegen auf die Entkoppelung von *stx<sub>2e</sub>*-Regulation und SOS-Antwort hin. So trat bei vier STEC-2e-Stämmen (82/02, E57, 42/02 und 1485/03) nach der Exposition gegenüber einem exogenen Faktor zwar Plaque-erzeugende Aktivität und Bakteriolyse auf, während in den Kulturüberständen wie nach der Standardanzucht nur wenig oder kein Stx2e nachweisbar war. Dies lässt den Schluss zu, dass in diesen Stämmen zwar eine SOS-Antwort auslösbar und Coliphagen induzierbar waren, die Aufregulation der Stx2e-Genexpression aber nicht ansprach, so dass die Phagen-vermittelte Bakteriolyse dann auch nicht mehr Stx2e freisetzen konnte als bereits unter Standardanzuchtbedingungen vorhanden war.

#### **5.4 Untersuchung auf Stx2e-konvertierende Bakteriophagen bei porcinen STEC-2e-Stämmen**

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Bildung und/oder Freisetzung von Stx2e bei STEC-Stämmen vom Schwein mit der Induktion von lytischen Phagen korreliert ist, wurden die 30 ausgewählten STEC-2e-Stämme mittels Plaquetest und Multiplex-PCR auf die Phagen-Bildung untersucht. Aus ökonomischen Gründen wurden in diesen Versuchen je Stamm

nur zwei potentiell stimulierende Substanzen eingesetzt. Dabei handelte es sich zum einen um das Fluorchinolon Norfloxacin, weil es weit weniger toxisch als MMC ist und es zahlreiche Hinweise in der Fachliteratur gibt, dass dieser Wirkstoff lysogene STEC-Stämme zur Bildung von infektionstüchtigen Stx-kodierenden Bakteriophagen stimulieren kann (Matsushiro *et al.* 1999, Łoś *et al.* 2010, McDonald *et al.* 2010, Yan *et al.* 2011). Auch der Phage  $\phi$ P27 ist durch Norfloxacin induzierbar. Aus diesem Grunde wurde sein natürlicher Wirtstamm *E. coli* 2771/97 in der vorliegenden Arbeit als Referenzstamm zur methodischen Kontrolle eingesetzt. Als zweiter, potentieller Stimulator wurde stammspezifisch derjenige Faktor (ein Antiinfektivum oder MMC oder UV-Licht) verwendet, der zuvor zu den größten Stx2e-Konzentrationen (nlog-Stx2e-Titer) im Kulturüberstand geführt hatte (sog. „optimaler exogener Faktor“).

Ein wichtiges Resultat dieser Versuche ist, dass ein Stx2e-kodierender Bakteriophage bei keinem der STEC-2e-Stämme nachweisbar war. In diesem Ergebnis stimmt die vorliegende Untersuchung vollständig mit einer anderen Studie überein, in der ein Stx2e-kodierender Bakteriophage bei 110 untersuchten STEC-2e-Stämmen verschiedenen Ursprungs ebenfalls nicht zu detektieren war (Beutin *et al.* 2008). Der Phage  $\phi$ P27 (Muniesa *et al.* 2000) bleibt deshalb der bisher einzige intakte Stx2e-kodierende Phage, den man bislang in einem STEC-2e-Feldstamm gefunden hat.

In der vorliegenden Dissertation wurden bei 12 von 30 STEC-2e-Feldstämmen (40 %) replikationsintakte, für den Empfängerstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  infektiöse Phagen in Form von Plaque-erzeugender Aktivität nachgewiesen. Da keiner dieser Plaques ein *stx*<sub>2e</sub>-spezifisches PCR-Signal abgab, wurde geschlussfolgert, dass diese nicht von *stx*<sub>2e</sub>-kodierenden Phagen verursacht wurden, sondern wahrscheinlich von anderen Coliphagen, die durch MMC, UV-Licht bzw. die Antiinfektiva Amoxicillin, Colistin, Enrofloxacin, Neomycin, Norfloxacin oder Tetrazyklin induziert worden waren. Bei allen STEC-2e-Stämmen, bei denen Plaques nach der Behandlung mit Norfloxacin auftraten, wurde die Plaque-erzeugende Aktivität auch durch den sog. optimalen exogenen Faktor induziert. Mit Ausnahme von 3 Stämmen waren dabei die nach der Behandlung mit beiden Faktoren induzierten Plaques morphologisch identisch. Dies spricht dafür, dass beide Noxen jeweils denselben lysogenen Phagen induzierten. Dabei war der optimale exogene Faktor aber offensichtlich stärker wirksam, da er stets höhere Plaquetiter induzierte als Norfloxacin. Eine besondere Ausnahme bildete der Stamm 4946/00, bei dem Norfloxacin eine Aktivität induzierte, die sowohl klare als auch trübe Plaques verursachte, Enrofloxacin dagegen eine Aktivität, die nur klare Plaques hinterließ. Dies lässt sich dahingehend deuten, dass Norfloxacin zwei verschiedene Bakteriophagen induzierte, Enrofloxacin aber nur einen davon, obwohl es sich bei beiden Wirkstoffen um Chinolone handelt, deren Molekül an Position 6 fluoriert ist. Der Hauptmetabolit von

Enrofloxacin ist Ciprofloxacin, welches sich von Norfloxacin durch den Substituent an Position 1 unterscheidet - Norfloxacin besitzt hier eine Ethylgruppe, Ciprofloxacin dagegen einen Cyclopropylrest (Stahlmann 2001b). Dieser Cyclopropylrest erhöht die antibakterielle Aktivität (Stahlmann 2001b). Eventuell begründet dies die fehlende Wirkung auf den zweiten Prophagen, den der Stamm 4946/00 in sich trägt.

Die Plaque-erzeugende Aktivität trat bei STEC-2e-Stämmen des O-Typs O141 signifikant gehäuft auf. Dies könnte bedeuten, dass diese Stämme durch denselben Phagen infiziert sind. Da bei den 8 O141-Stämmen aber mindestens fünf morphologisch voneinander abgrenzbare Erscheinungsformen der Plaques beobachtet wurden (groß und klar; groß und trüb; sehr klein; trüb; klein und trüb), dürfte es sich um unterschiedliche Phagen gehandelt haben. Außerdem war die Plaque-erzeugende Aktivität in den filtrierten Kulturüberständen der beiden O141-Stämme 82/02 und 1485/03 erst bei der Verwendung erheblich geringerer Mengen an Testsuspension zu erkennen. Diese Beobachtung deutet auf Phagen mit besonders hoher Virulenz für den Empfängerstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  hin. Da sich die Plaques bei diesen Stämmen in ihrem Aussehen ebenfalls voneinander unterschieden, waren somit ein sechster und siebter Phagen-Phänotyp zu unterscheiden.

Wie bei den oben genannten O141-Stämmen 82/02 und 1485/03 übten auch die filtrierten Kulturüberstände der Stämme P5194/03-2 und P5196/03-2 einen so starken lytischen Effekt auf den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  aus, dass einzelne Plaques nicht erkennbar wurden. Im Gegensatz zu jenen Stämmen blieb dieses morphologische Bild aber auch dann noch bestehen, wenn geringere Mengen der Testsuspension verwendet wurden. Der Effekt wurde deshalb nicht als Plaque-erzeugende Aktivität klassifiziert. Dennoch ist es möglich, dass auch hier hochvirulente Phagen ursächlich waren. Bei den wenigen *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Bakterienkolonien, die auf jenen Agarplatten unzerstört blieben, könnte es sich dann um neue Lysogene gehandelt haben.

In den vorgestellten Untersuchungen bestand keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Plaque-erzeugender Aktivität, der Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand sowie der unter dem Einfluss der exogenen Faktoren eingetretenen und photometrisch ermittelten Bakterienzelllyse. Insbesondere offenbarten die untersuchten STEC-2e-Stämme kein Reaktionsmuster, aus dem schlüssig auf einen einzigen und einheitlichen Stx2e-Freisetzungsmechanismus geschlossen werden konnte. Immerhin schied die Induktion von lysogenen Stx2e-kodierenden Phagen mit der daran anschließenden, durch diesen Phagen vermittelten Bakterienzelllyse als Funktionsprinzip aus, da ja überhaupt kein *stx*<sub>2e</sub>-kodierender Phage nachgewiesen werden konnte. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu anderen Publikationen, in denen in der Induktion ebensolcher Phagen der einzige Mechanismus der Stx-Freisetzung erkannt wurde (Karch *et al.* 1999, Schmidt 2001, Wagner *et al.* 2001a, Wagner und Waldor

2002, Herold *et al.* 2004). Die Unterschiede zu diesen Publikationen lassen sich methodisch nicht ohne weiteres begründen, da in den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation die üblichen Laborverfahren zum Phagennachweis eingesetzt wurden (Muniesa *et al.* 2000, Johansen *et al.* 2001, Koch *et al.* 2001, Teel *et al.* 2002, Muniesa *et al.* 2004a, Muniesa *et al.* 2004b, Garcia-Aljaro *et al.* 2006, Garcia-Aljaro *et al.* 2009, Imamovic *et al.* 2010b, Granobles Velandia *et al.* 2012). Allerdings wurde in den zitierten Untersuchungen, abweichend von dem Vorgehen in der Dissertation, zur Phageninduktion stets MMC (f. c. 0,5 - 0,8 µg/ml) statt Norfloxacin bzw. statt der Bestrahlung mit UV-Licht bzw. der verschiedenen Antiinfektiva (sog. „optimaler exogener Faktor“) verwendet. Zudem wurden die Einwirkdauer von MMC, die Konzentration von CaCl<sub>2</sub>, das eingesetzte Volumen sowie die Dichte der Empfängerstammkultur von *E. coli* DH5α sowie die Dauer und Art der Präinkubation von filtriertem Überstand und Empfängerstammkultur anders gewählt. Außerdem setzten einige Untersucher dem filtrierten Überstand DNase, RNase oder Chloroform zu, so dass ein Einfluss dieser methodischen Variationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Wenn auch *stx*<sub>2e</sub>-kodierende Phagen als Erklärung ausscheiden, so ist aber nicht auszuschließen, dass das Stx<sub>2e</sub> im Zuge des lytischen Replikationszyklus anderer, das heißt *stx*<sub>2e</sub>-negativer, Coliphagen aus der Bakterienzelle freigesetzt wurde. Dies könnte in dieser Arbeit bei denjenigen 4 STEC-2e-Stämmen (von 11 STEC-2e-Stämmen) eine Rolle gespielt haben, bei denen unter dem Einfluss eines verwendeten Faktors die Konzentration an freiem Stx<sub>2e</sub> anstieg und Plaque-erzeugende Aktivität im Kulturüberstand nachweisbar war: 4946/00, P5413/04-1, P8615/00-1 und 3465/04-2. Möglicherweise trifft das unter diesen 11 Stämmen aber auch noch auf weitere Stämme zu. Denn es ist gut denkbar, dass mit dem verwendeten *E. coli*-Empfängerstamm DH5α nicht alle vorhandenen, infekti- und replikationsfähigen Coliphagen detektiert werden konnten, und die Überstände der 7 anderen Stämme nur aus diesem Grund im Plaque-Test negativ reagierten. Insbesondere die Reaktionen des EDEC-Stammes P868/02 geben Anlass, diese Möglichkeit in Betracht zu ziehen. Dieser Stamm reagierte auf die MMC-Exposition nämlich mit einem Anstieg der Stx<sub>2e</sub>-Konzentration im Kulturüberstand auf das 47,3-Fache (**Tabelle 22**). Gleichzeitig hatte MMC hier den stärksten bakteriolytischen Effekt (**Tabelle 25**), obwohl Plaque-erzeugende Aktivität bei diesem Stamm nicht nachweisbar war (**Tabelle 30**). MMC wirkt zwar selbst bakterizid (Suzuki und Kilgore 1967, Kwan *et al.* 2015) und kann deshalb als Ursache der Bakteriolyse bei Stamm P868/02 nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Beobachtung, dass drei andere STEC-2e-Stämme auf dieselbe MMC-Dosis nicht mit Lyse reagierten, spricht jedoch gegen dieses Argument. Auch spricht der umgekehrte Befund, dass nämlich 6 Stämme im Plaque-Test positiv reagierten (**Tabelle 30**), an ihnen aber kein bakteriolytischer Effekt sichtbar wurde (**Tabelle 25**), nicht zwingend dagegen, den vorhandenen bakteriolytischen Effekt als Indiz für die

Induktion eines lytischen Phagen zu interpretieren. Denn das Fehlen der Lyse gemäß des Kriteriums, wie es für die vorliegende Dissertation festgelegt wurde ( $OD_{600nm}$  der Bakterien-suspension nimmt während der 4-stündigen Inkubationsdauer ab), kann viele Gründe gehabt haben. Beispielsweise könnte der Phage nur einen so kleinen Teil der Bakterienkultur bis zum zweiten Messzeitpunkt lysiert haben, dass dies messtechnisch nicht zu erfassen war.

Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  scheint von verschiedenen *E. coli*-K12-Abkömmlingen sehr gut dazu geeignet zu sein, um Coliphagen und speziell die Stx-kodierenden Coliphagen zu detektieren (Muniesa *et al.* 2004a). Dennoch gibt es Coliphagen, die nicht in der Lage sind, auf dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  zu replizieren (Garcia-Aljaro *et al.* 2009, Imamovic *et al.* 2010b). In zukünftigen Versuchen sollte deshalb ein breiteres Spektrum an verschiedenen *E. coli*-Empfängerstämmen eingesetzt werden, um induzierbaren Phagen bei STEC-2e-Stämmen nachzuspüren.

Die Frage, ob das Shigatoxin bei STEC-2e-Stämmen neben der Phagen-vermittelten Bakteriolyse auch noch über andere Wege aus dem periplasmatischen Raum in das umgebende Milieu gelangt, kann anhand der in dieser Arbeit generierten Daten nicht beantwortet werden. Auf die Existenz eines solchen Systems weist der Befund hin, dass freies Stx2e bei immerhin 357 von 365 (97,8 %) STEC-2e-Stämmen ja auch schon nach ihrer Anzucht unter Standardbedingungen nachweisbar war. Vereinzelt berichten andere Autoren auch von STEC-Stämmen mit anderen Stx-Subtypen, dass Shigatoxin bei manchem Stamm auch dann frei im Kulturüberstand vorliegt, wenn kein Antibiotikum eingewirkt hat und keine Phagen-vermittelte Bakteriolyse beobachtet worden ist (Ochoa *et al.* 2007). Eine Erklärung für dieses Phänomen fehlt bislang. Für weitergehende Untersuchungen bieten sich aus der vorliegenden Dissertation vor allem diejenigen 6 Stämme an, bei denen es unter dem Einfluss des „optimalen exogenen Faktors“ zum Konzentrationsanstieg des freien Stx2e gekommen war, jedoch weder Bakteriolyse noch Plaque-erzeugende Aktivität ermittelt werden konnte.

## 5.5 Fazit und Schlussfolgerungen

Die durchgeführten Untersuchungen machten deutlich, dass porcine STEC-2e-Stämme hinsichtlich ihres Stx2e-Bildungs- und Freisetzungsvermögens außerordentlich heterogen sind. Setzt man voraus, dass in Analogie zu anderen STEC-Typen auch in STEC-2e-Stämmen die Stx2e-Gene stets Teile eines späten Expressionmoduls lambdoider Prophagen sind (Karch *et al.* 1999, Plunkett *et al.* 1999, Wagner *et al.* 1999, Friedman und Court 2001, Wagner *et al.* 2001a, Recktenwald und Schmidt 2002, Wagner und Waldor 2002, Muniesa *et al.* 2003), dann lässt sich die beobachtete Reaktionsvielfalt auf exogene Signale eigentlich nur dadurch erklären, dass diese Phagen in unterschiedlichem Ausmaße defekt sind und

möglicherweise sogar nur noch bruchstückhaft, als sog. „*remnants*“ vorliegen. Deshalb besitzen Bakteriophagen bei porcinen STEC-2e-Stämmen wahrscheinlich nicht die gleiche Bedeutung für die horizontale Verbreitung der Stx-Gene in *E. coli*-Populationen sowie für die Stx2e-Bildung in und -Freisetzung aus dem einzelnen STEC-Stamm, wie das bei humanen oder bovinen STEC der Fall ist.

## 6 Zusammenfassung

Die Ödemkrankheit (*Edema Disease*, ED) ist eine weltweit verbreitete und wirtschaftlich bedeutsame Allgemeinerkrankung junger Schweine, die von besonderen Stämmen der Bakterienspezies *Escherichia coli* (*Edema Disease E. coli*, EDEC) verursacht wird. Das Exotoxin Stx2e und F18-Fimbrien sind die charakteristischen und für die Pathogenese der ED maßgeblichen Virulenzfaktoren dieser Erreger. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Stx2e-kodierende *E. coli*-Isolate (STEC-2e) von Schweinen das Stx2e auch *in vitro* bilden und freisetzen können und ob antibakterielle Noxen wie UV-Licht, Mitomycin C und bestimmte Antiinfektiva die Freisetzung von Stx2e und *stx*<sub>2e</sub>-kodierenden Bakteriophagen stimulieren.

Für die Untersuchung standen insgesamt 365 STEC-2e-Stämme, die in den Jahren 2000 - 2006 von Schweinen in Deutschland isoliert worden waren, zur Verfügung. Die Stx2e-Bildung dieser Stämme wurde quantitativ mit dem Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) sowie einem selbst etablierten Antigen-ELISA (Stx2e-ELISA) untersucht. Die Stimulationsversuche wurden an 30 ausgewählten STEC-2e-Stämmen vorgenommen. Die Wirkung von Antiinfektiva auf die Stx2e-Freisetzung wurde mit Amoxicillin, Colistin, Enrofloxacin, Erythromycin, Neomycin und Tetrazyklin geprüft, wobei diese stammspezifisch in der jeweiligen minimalen Hemmkonzentration (MHK) zum Einsatz kamen. Im Rahmen der Stimulationsversuche wurden zwei Parallelkulturen mit und ohne Einwirkung der jeweiligen Noxe angesetzt und anschließend in beiden Ansätzen das freie Stx2e mit dem Stx2e-ELISA bestimmt. Die Anregung der 30 STEC-2e-Stämme zur Freisetzung von lytischen Bakteriophagen wurde mit Norfloxacin und derjenigen Noxe (Antiinfektivum, Mitomycin C oder UV-Licht) versucht, die in den oben beschriebenen Versuchen auf die Stx2e-Freisetzung jeweils am stärksten stimulierend gewirkt hatte. Die Prüfung auf Bakteriophagen erfolgte quantitativ im Plaquetest, wobei der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  als Empfänger fungierte. Zur Untersuchung von *E. coli*-Stämmen und Bakteriophagen-haltigen Kulturüberständen auf Virulenzgene fanden verschiedene PCRs Anwendung.

Nach Anzucht unter Standardbedingungen war Stx2e bei 357 (97,8 %) der 365 untersuchten STEC-2e-Stämme mittels Vero-ZT im Kulturüberstand nachweisbar, wenngleich meist nur in geringen Konzentrationen. Lediglich die Proben von sechs Stämmen enthielten eine zytotoxische Aktivität von über 4.300 CD<sub>50</sub>/ml und damit sogar etwas mehr als der Überstand von dem humanen STEC-2e-Positivkontrollstamm 2771/97. Wegen der höheren Nachweisgrenze des Stx2e-ELISA (ca. 600 CD<sub>50</sub>/ml) reagierten hier die Kulturüberstände von nur 79 Stämmen (21,6 %) positiv. Die Messwerte aus Stx2e-ELISA und Vero-ZT korrelierten signifikant positiv miteinander ( $p < 0,001$ ). Nach den Ergebnissen im Stx2e-ELISA war Stx2e



bei 158 Stämmen (43,3 %) ausschließlich zellassoziiert nachweisbar, bei 41 Stämmen (11,2 %) nur im Kulturüberstand und bei 38 Stämmen (10,4 %) in beiden Kompartimenten. Bezüglich der subzellulären Stx2e-Lokalisation bestanden Unterschiede in Abhängigkeit vom Virulenzgenprofil der Stämme: Die typischen Ödemkrankheitserreger (EDEC; *stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>*, *fedA<sup>+</sup>*) wiesen signifikant höhere Gehalte an zellassoziiertem Stx2e auf als andere Stämme ( $p < 0,001$ ). Umgekehrt waren bei den sonstigen STEC-2e- (*stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>*) und den EDEC/ETEC-Stämmen (*stx<sub>2e</sub><sup>+</sup>*, *fedA<sup>+</sup>*, *estap<sup>+</sup>/estb<sup>+</sup>/elf<sup>+</sup>*) signifikant höhere Mengen an Stx2e im Kulturüberstand vorhanden als bei EDEC-Stämmen ( $p < 0,001$ ).

Bei der MHK-Bestimmung zeigten sich von den 30 ausgewählten STEC-2e-Stämmen einige als resistent gegen Tetrazyklin (21 Stämme; 70 %), Amoxicillin (15; 50 %), Colistin (11; 37 %) und/oder Neomycin (8; 27 %). Alle getesteten Stämme waren Enrofloxacin-sensibel. Insgesamt ließ sich bei 11 (36,7 %) der 30 Stämme mit wenigstens einer der nachfolgend genannten Noxen ein Anstieg der Stx2e-Konzentration im Kulturüberstand induzieren: UV-Licht, Mitomycin C, Amoxicillin, Enrofloxacin und Neomycin. Am stärksten nahm die Stx2e-Konzentration (bis zu 50,8-facher Anstieg) unter dem Einfluss von Mitomycin C, UV-Licht oder Enrofloxacin zu. Dagegen vermochte Tetrazyklin die Stx2e-Freisetzung bei keinem einzigen Stamm zu steigern. Am häufigsten konnte die Stx2e-Freisetzung bei EDEC-Stämmen stimuliert werden (7 von 10 Stämmen, 70 %).

Sowohl nach der Behandlung mit Norfloxacin als auch nach der Behandlung mit der jeweils zweiten eingesetzten Noxe war bei 12 der 30 STEC-2e-Stämme (40 %) Plaque-bildende Aktivität im Kulturüberstand nachweisbar. Hinsichtlich der Menge an freigesetztem Stx2e unterschieden sich diese Stämme im Mittel aber nicht von den im Plaquetest negativen Stämmen. Das Auftreten von Plaque-bildender Aktivität korrelierte auch nicht mit der Klassifikation der Stämme in EDEC, EDEC/ETEC oder sonstige STEC-2e. Bei keinem der 30 Stämme war ein *stx<sub>2e</sub>*-kodierender Bakteriophage induzierbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass nahezu alle STEC-2e-Stämme *in vitro* zur Stx2e-Bildung und -Freisetzung fähig sind. Im Vergleich zu humanen STEC sind die von porcinen STEC-2e-Stämmen freigesetzten Mengen aber gering. Stx2e scheint bei vielen *E. coli*-Stämmen aus der Bakterienzelle sezerniert und nicht erst bei der von Bakteriophagen verursachten Bakterienzelllyse freigesetzt zu werden. Stx2e-Bildung und/oder Stx2e-Freisetzung sind offenbar stammspezifisch reguliert, weshalb die im Darm infizierter Schweine freigesetzte Stx2e-Menge von den spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Stammes abhängig sein dürfte und gegenwärtig ohne gezielte Laboruntersuchungen nicht prognostiziert werden kann. Es ist damit zu rechnen, dass die Applikation von bestimmten Antiinfektiva die Stx2e-Freisetzung der EDEC-Stämme auch *in vivo* ankurbelt und damit den Ausbruch von Ödemkrankheit oder deren Exazerbation provozieren kann.

## 7 Summary

Edema disease (ED) is a severe systemic disease of young pigs that is caused by specific strains of *Escherichia coli* (Edema Disease *E. coli*, EDEC). The disease occurs worldwide and causes major economic losses in pig husbandry. The Shiga toxin subtype Stx2e and F18 fimbriae are distinguishing EDEC virulence factors and are causatively involved in ED pathogenesis. The objective of the present study was to elucidate whether Stx2e-encoding *E. coli* (STEC-2e) isolates from pigs are capable of producing and releasing Stx2e *in vitro* and whether antibacterial noxa like UV irradiation, mitomycin C and certain antiinfectives can stimulate the release of Stx2e and *stx*<sub>2e</sub>-converting bacteriophages.

STEC-2e strains (n = 365) isolated from pigs in Germany from 2000 through 2006 were examined. Stx2e production of these strains was quantified by the vero cell cytotoxicity assay (Vero-CA) as well as by a self-established antigen-ELISA (Stx2e-ELISA). Stimulation experiments were performed with 30 STEC-2e strains selected according to their virulence genes and O types. Amoxicillin, colistin, enrofloxacin, erythromycin, neomycin and tetracycline were used to study the effect of antiinfectives on bacterial Stx2e release. Antiinfectives were applied at the dose equivalent to their strain-specific minimum inhibitory concentration (MIC). During the stimulation experiments duplicate cultures of each strain were incubated with and without the particular factor under investigation, respectively, and the amount of free Stx2e was subsequently determined using the Stx2e-ELISA. Norfloxacin and that particular factor (antiinfective, mitomycin C or UV irradiation) that had the strongest positive effect on Stx2e release were chosen to provoke the release of lytic bacteriophages from the 30 selected STEC-2e strains. The induction of bacteriophages was quantitatively assayed by a plaque test with *E. coli* DH5 $\alpha$  as the recipient strain. *E. coli* strains and bacteriophage-containing bacterial supernatants were tested for several virulence genes by PCR.

After culturing bacteria under standard conditions Stx2e was detected in culture supernatants of 357 of 365 (97.8 %) strains by Vero-CA although concentrations were rather low. Supernatants of only six strains contained cytotoxic activities above 4,300 CD<sub>50</sub>/ml which was slightly more than detected in the culture supernatant of human STEC-2e positive control strain 2771/97. Because of the higher detection limit of the Stx2e-ELISA (approx. 600 CD<sub>50</sub>/ml), supernatants of only 79 strains (21.6 %) tested positive in this assay. Values of the Stx2e-ELISA and those of the Vero-CA correlated positively with each other (p < 0.001). According to the Stx2e-ELISA data Stx2e was exclusively cell-associated in 158 STEC-2e strains (43.3 %) while in 41 strains (11.2 %) it was detected only in culture supernatants. In 38 strains (10.4 %) both compartments tested positive for Stx2e. Localization of Stx2e in the

bacterial cell or the culture supernatant or both compartments was associated with the virulence gene profiles of the strains. On average typical EDEC strains (*stx<sub>2e</sub>*<sup>+</sup>, *fedA*<sup>+</sup>) displayed a significantly higher amount of cell-associated Stx2e than all other strains ( $p < 0.001$ ). Vice versa, culture supernatants of other STEC-2e strains (*stx<sub>2e</sub>*<sup>+</sup>) and of EDEC/ETEC strains (*stx<sub>2e</sub>*<sup>+</sup>, *fedA*<sup>+</sup>, *estap*<sup>+</sup>/*estb*<sup>+</sup>/*elt*<sup>+</sup>) contained significantly higher amounts of free Stx2e than did those of EDEC strains ( $p < 0.001$ ).

MIC assessment revealed that several of the 30 selected STEC-2e strains were resistant to tetracycline (21 strains, 70 %), amoxicillin (15; 50 %), colistin (11; 37 %) and/or neomycin (8; 27 %). All tested strains were sensitive to enrofloxacin. Exposure of the strains to at least one of the following factors was accompanied by an increased Stx2e concentration in the culture supernatant in 11 (36.7 %) strains: UV irradiation, mitomycin C, amoxicillin, neomycin and enrofloxacin. The most prominent increase of Stx2e concentration was observed after treatment with mitomycin C, UV light or enrofloxacin (up to 50.8-fold). Tetracycline did not increase the Stx2e release in any strain tested. The proportion of strains reacting with increased Stx2e release upon anti-infective exposure was most pronounced among EDEC strains (7 of 10 strains, 70 %).

Plaque-forming activity was detected in the culture supernatants of 12 of 30 STEC-2e strains (40 %) after treatment with norfloxacin or the particular second factor. However, strains with and without plaque-forming activity did not differ from each other in the average amount of free Stx2e. Furthermore, occurrence of plaque-forming activity was not correlated with the classification of strains as EDEC, EDEC/ETEC or other STEC-2e. A *stx<sub>2e</sub>*-converting bacteriophage was not induced in any of the 30 STEC-2e strains tested.

The results show that nearly all STEC-2e strains are capable to produce and release Stx2e during growth *in vitro*. However, the amounts of released Stx2e are low in porcine STEC-2e strains compared to Stx released by human STEC. In several STEC-2e strains Stx2e seems to be secreted by the bacterial cell rather than being released from the cell via bacteriophage-mediated lysis. The broad spectrum of reactions to exogenous factors suggests that regulation of Stx2e production and/or release is strain-specific. That is why the amount of Stx2e released in the intestine of infected pigs probably depends on specific properties of the individual strain and currently can not be predicted without aimed laboratory investigations. It has to be considered that administration of certain anti-infectives to pigs may stimulate intestinal EDEC strains *in vivo* to produce and release Stx2e at mucosal sites which then can provoke the onset of edema disease or its exacerbation.

## 8 Literaturverzeichnis

- Acheson, D. W., Gerald T. Keusch** (1999). The family of Shiga toxins. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. J. E. A. a. J. H. Freer, Academic Press Inc.: S. 229-242.
- Acheson, D. W., J. Reidl, X. Zhang, G. T. Keusch, J. J. Mekalanos und M. K. Waldor** (1998). "In vivo transduction with Shiga toxin 1-encoding phage." *Infect Immun* **66**(9): 4496-4498.
- Aerts, A., D. Faster und C. W. Michiels** (2005). "Induction of Shiga toxin-converting prophage in *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure." *Appl Environ Microbiol* **71**(3): 1155-1162.
- Althaus, E. W., C. E. Outten, K. E. Olson, H. Cao und T. V. O'Halloran** (1999). "The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein." *Biochemistry* **38**(20): 6559-6569.
- Ashkenazi, S. und T. G. Cleary** (1990). "A method for detecting Shiga toxin and Shiga-like toxin-I in pure and mixed culture." *J Med Microbiol* **32**(4): 255-261.
- AVID** (2000). Resistenzbestimmungen schnell wachsender Bakterien (Agardiffusionstest), Lieferung X/1998. Tabelle 2 "Bewertung der Hemmhofdurchmesser und Grenzwertkonzentrationen der in der Veterinärmedizin zugelassenen Antibiotika", Lieferung XII/2000: 8a-9.
- Barth, S., A. Tscholshiew, G. Vallejo und R. Bauerfeind** (2003). "Characterization of Shigatoxin-encoding *Escherichia coli* (STEC) isolates from pigs in Germany." *Int J Med Microbiol* **293**(36): 421.
- Beckwith, J.** (2013). "The Sec-dependent pathway." *Res Microbiol* **164**(6): 497-504.
- Bergholz, T. M., L. M. Wick, W. Qi, J. T. Riordan, L. M. Ouellette und T. S. Whittam** (2007). "Global transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium." *BMC Microbiol* **7**: 97.
- Bertschinger, H. U., M. Bachmann, C. Mettler, A. Pospischil, E. M. Schraner, M. Stamm, T. Sydler und P. Wild** (1990). "Adhesive fimbriae produced *in vivo* by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs." *Vet Microbiol* **25**(2-3): 267-281.
- Bertschinger, H. U. und C. L. Gyles** (1994). Oedema disease of pigs. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. C. L. Gyles. Wallingford, UK, Cab International: S. 193-219.
- Bertschinger, H. U. und J. Pohlenz** (1983). "Bacterial colonization and morphology of the intestine in porcine *Escherichia coli* enterotoxemia (edema disease)." *Vet Pathol* **20**(1): 99-110.
- Beutin, L., J. A. Hammerl, E. Strauch, J. Reetz, R. Dieckmann, Y. Kelner-Burgos, A. Martin, A. Miko, N. A. Strockbine, B. A. Lindstedt, D. Horn, H. Monse, B. Huettel, I. Müller, K. Stüber und R. Reinhardt** (2012). "Spread of a distinct Stx2-encoding phage prototype among *Escherichia coli* O104:H4 strains from outbreaks in Germany, Norway, and Georgia." *J Virol* **86**(19): 10444-10455.
- Beutin, L., U. Krüger, G. Krause, A. Miko, A. Martin und E. Strauch** (2008). "Evaluation of major types of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans." *Appl Environ Microbiol* **74**(15): 4806-4816.
- Beutin, L., H. Steinrück, G. Krause, K. Steege, S. Haby, G. Hultsch und B. Appel** (2007). "Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources." *J Appl Microbiol* **102**(3): 630-639.

- Beutin, L., E. Strauch und I. Fischer** (1999). "Isolation of *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin." *Lancet* **353**(9163): 1498.
- Bielaszewska, M., A. W. Friedrich, T. Aldick, R. Schürk-Bulgrin und H. Karch** (2006). "Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome." *Clin Infect Dis* **43**(9): 1160-1167.
- Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson und C. L. Gyles** (1999). "Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans." *J Clin Microbiol* **37**(3): 497-503.
- Boyd, B., G. Tyrrell, M. Maloney, C. Gyles, J. Brunton und C. Lingwood** (1993). "Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters *in vivo* tissue targeting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs." *J Exp Med* **177**(6): 1745-1753.
- Bürk, C., R. Dietrich, G. Açar, M. Moravek, M. Bülte und E. Märklbauer** (2003). "Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin." *J Clin Microbiol* **41**(5): 2106-2112.
- BVL, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und Infektiologie Freiburg** (2008). GERMAP 2008 - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach, Antiinfectives Intelligence.
- BVL, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und Infektiologie Freiburg** (2014). GERMAP 2012 - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach, Antiinfectives Intelligence.
- Calderwood, S. B., D. W. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barret, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr und I. K. Wachsmuth** (1996). "Proposed new nomenclature for Shiga-like toxin (Verotoxin) family." *ASM News* **62**: 118-119.
- Calderwood, S. B., F. Auclair, A. Donohue-Rolfe, G. T. Keusch und J. J. Mekalanos** (1987). "Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(13): 4364-4368.
- Calderwood, S. B. und J. J. Mekalanos** (1987). "Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus." *J Bacteriol* **169**(10): 4759-4764.
- Calderwood, S. B. und J. J. Mekalanos** (1988). "Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid." *J Bacteriol* **170**(2): 1015-1017.
- Carbonell, G. V., A. F. Alfieri, A. A. Alfieri, M. C. Vidotto, C. E. Levy, A. L. Darini und R. M. Yanaguita** (1997). "Detection of cytotoxic activity on Vero cells in clinical isolates of *Serratia marcescens*." *Braz J Med Biol Res* **30**(11): 1291-1298.
- Carey, C. M., M. Kostrzynska, S. Ojha und S. Thompson** (2008). "The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *J Microbiol Methods* **73**(2): 125-132.
- Carter, A. O., A. A. Borczyk, J. A. Carlson, B. Harvey, J. C. Hockin, M. A. Karmali, C. Krishnan, D. A. Korn und H. Lior** (1987). "A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home." *N Engl J Med* **317**(24): 1496-1500.
- Casey, T. A. und B. T. Bosworth** (2009). "Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine." *J Vet Diagn Invest* **21**(1): 25-30.

- Cerny, G. und M. Teuber** (1971). "Differential release of periplasmic versus cytoplasmic enzymes from *Escherichia coli* B by polymyxin B." Arch Mikrobiol **78**(2): 166-179.
- Chatzi, K. E., M. F. Sardis, S. Karamanou und A. Economou** (2013). "Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system." Biochem J **449**(1): 25-37.
- Chen, Y. und A. Zychlinsky** (1994). "Apoptosis induced by bacterial pathogens." Microb Pathog **17**(4): 203-212.
- Cherla, R. P., S. Y. Lee und V. L. Tesh** (2003). "Shiga toxins and apoptosis." FEMS Microbiol Lett **228**(2): 159-166.
- China, B. und F. Goffaux** (1999). "Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*." Vet Res **30**(2-3): 181-202.
- Ching, J. C., N. L. Jones, P. J. Ceponis, M. A. Karmali und P. M. Sherman** (2002). "*Escherichia coli* Shiga-like toxins induce apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase via *in vitro* activation of caspases." Infect Immun **70**(8): 4669-4677.
- Choi, C., H. J. Ham, D. Kwon, J. Kim, D. S. Cheon, K. Min, W. S. Cho, H. K. Chung, T. Jung, K. Jung und C. Chae** (2002). "Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea." J Vet Med Sci **64**(1): 71-73.
- CLSI** (2002). Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft. Deutsche Übersetzung der Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" der DVG. **Dokumente M31-A2, M31-S1 (2. Ausgabe)**.
- CLSI** (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. **CLSI document M100-S25**.
- Clugston, R. E. und N. O. Nielsen** (1974). "Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). I. Detection and preparation of an active principle." Can J Comp Med **38**(1): 22-28.
- Clugston, R. E., N. O. Nielsen und D. L. Smith** (1974). "Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). 3. Pathology and pathogenesis." Can J Comp Med **38**(1): 34-43.
- Conradi, H.** (1903). "Ueber lösliche, durch aseptische Autolyse erhaltene Giftstoffe von Ruhr- und Typhusbazillen." Dtsch. Med. Wochenschr. **29**: 26-28.
- Cornick, N. A., A. F. Helgersen, V. Mai, J. M. Ritchie und D. W. Acheson** (2006). "*In vivo* transduction of an Stx-encoding phage in ruminants." Appl Environ Microbiol **72**(7): 5086-5088.
- Cornick, N. A., S. Jelacic, M. A. Ciol und P. I. Tarr** (2002). "*Escherichia coli* O157:H7 infections: discordance between filterable fecal Shiga toxin and disease outcome." J Infect Dis **186**(1): 57-63.
- Cornick, N. A., I. Matise, J. E. Samuel, B. T. Bosworth und H. W. Moon** (2000). "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease." J Infect Dis **181**(1): 242-251.
- Creuzburg, K.** (2008). Protokoll Phagenisolation. Persönl. Mitteilung: Elektronischer Brief, versandt am 21.10.2008.
- Creuzburg, K., B. Köhler, H. Hempel, P. Schreier, E. Jacobs und H. Schmidt** (2005). "Genetic structure and chromosomal integration site of the cryptic prophage CP-1639 encoding Shiga toxin 1." Microbiology **151**(Pt 3): 941-950.
- Davis, J. W., R. C. Allen und R. M. Smibert** (1961). "Studies on hemolytic *Escherichia coli* associated with edema disease of swine, I. Separation and properties of a toxin of hemolytic *Escherichia coli*." Am J Vet Res **22**: 736-740.

- Dayao, D. A., M. Kienzle, J. S. Gibson, P. J. Blackall und C. Turni** (2014). "Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for *Haemophilus parasuis*." *Vet Microbiol* **172**(3-4): 586-589.
- De Grandis, S., J. Ginsberg, M. Toone, S. Climie, J. Friesen und J. Brunton** (1987). "Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B." *J Bacteriol* **169**(9): 4313-4319.
- De Grandis, S., H. Law, J. Brunton, C. Gyles und C. A. Lingwood** (1989). "Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin." *J Biol Chem* **264**(21): 12520-12525.
- De Greve, H., C. Qizhi, F. Deboeck und J. P. Hernalsteens** (2002). "The Shiga-toxin VT2-encoding bacteriophage  $\phi$ 297 integrates at a distinct position in the *Escherichia coli* genome." *Biochim Biophys Acta* **1579**(2-3): 196-202.
- de Jong, A., V. Thomas, S. Simjee, H. Moyaert, F. El Garch, K. Maher, I. Morrissey, P. Butty, U. Klein, H. Marion, D. Rigaut und M. Valle** (2014). "Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study." *Vet Microbiol* **172**(1-2): 202-215.
- Donohue-Rolfe, A. und G. T. Keusch** (1983). "*Shigella dysenteriae* 1 cytotoxin: periplasmic protein releasable by polymyxin B and osmotic shock." *Infect Immun* **39**(1): 270-274.
- Dowd, S. E. und J. B. Williams** (2008). "Comparison of Shiga-like toxin II expression between two genetically diverse lineages of *Escherichia coli* O157:H7." *J Food Prot* **71**(8): 1673-1678.
- Downes, F. P., J. H. Green, K. Greene, N. Strockbine, J. G. Wells und I. K. Wachsmuth** (1989). "Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II." *J Clin Microbiol* **27**(6): 1292-1297.
- Drlica, K. und X. Zhao** (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(3): 377-392.
- Dutta, S., K. Iida, A. Takade, Y. Meno, G. B. Nair und S. Yoshida** (2004). "Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and *in vitro* effects of antimicrobials on toxin production and release." *Microbiol Immunol* **48**(12): 965-969.
- DVG.** (2006). "Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz, Layoutempfehlungen - Infektionen bei Großtieren." Zugriff am 12.01.2015, <http://antibiotikaresistenz.dvg.net/index.php?id=647>.
- EMA** (2011). Guideline on bioanalytical method validation. London. **EMEA/CHMP/EWP/192217/2009**.
- Emmerich, I., Henry Ottilie** (2013). VETIDATA. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht, abrufbar unter [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de), Universität Leipzig.
- Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara und K. Igarashi** (1988). "Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins." *Eur J Biochem* **171**(1-2): 45-50.
- EU-Parlament/-Rat** (2003). Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. Amtsblatt der Europäischen Union. **L 268**: 29-43.
- EUCAST** (2013). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1.
- Fairbrother, J. M., E. Nadeau und C. L. Gyles** (2005). "*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies." *Anim Health Res Rev* **6**(1): 17-39.

- Fratamico, P. M., A. A. Bhagwat, L. Injaian und P. J. Fedorka-Cray** (2008). "Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from swine feces." *Foodborne Pathog Dis* **5**(6): 827-838.
- Friedman, D. I. und D. L. Court** (2001). "Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing." *Curr Opin Microbiol* **4**(2): 201-207.
- Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon und H. Karch** (2002). "*Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms." *J Infect Dis* **185**(1): 74-84.
- Fuchs, S., I. Mühldorfer, A. Donohue-Rolfe, M. Kerenyi, L. Emody, R. Alexiev, P. Nenkov und J. Hacker** (1999). "Influence of RecA on *in vivo* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens." *Microb Pathog* **27**(1): 13-23.
- Gannon, V. P. und C. L. Gyles** (1990). "Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease." *Vet Microbiol* **24**(1): 89-100.
- Gannon, V. P., C. L. Gyles und R. W. Friendship** (1988). "Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs." *Can J Vet Res* **52**(3): 331-337.
- Gannon, V. P., C. Teerling, S. A. Masri und C. L. Gyles** (1990). "Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family." *J Gen Microbiol* **136**(6): 1125-1135.
- Garcia-Aljaro, C., M. Muniesa, J. Jofre und A. R. Blanch** (2006). "Newly identified bacteriophages carrying the *stx<sub>2g</sub>* Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters." *FEMS Microbiol Lett* **258**(1): 127-135.
- Garcia-Aljaro, C., M. Muniesa, J. Jofre und A. R. Blanch** (2009). "Genotypic and phenotypic diversity among induced, *stx<sub>2</sub>*-carrying bacteriophages from environmental *Escherichia coli* strains." *Appl Environ Microbiol* **75**(2): 329-336.
- Garred, O., E. Dubinina, P. K. Holm, S. Olsnes, B. van Deurs, J. V. Kozlov und K. Sandvig** (1995a). "Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants." *Exp Cell Res* **218**(1): 39-49.
- Garred, O., B. van Deurs und K. Sandvig** (1995b). "Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin." *J Biol Chem* **270**(18): 10817-10821.
- Gentry, M. K. und J. M. Dalrymple** (1980). "Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin." *J Clin Microbiol* **12**(3): 361-366.
- Gerlach, R. G. und M. Hensel** (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." *Int J Med Microbiol* **297**(6): 401-415.
- Gobius, K. S., G. M. Higgs und P. M. Desmarchelier** (2003). "Presence of activatable Shiga toxin genotype (*stx<sub>2d</sub>*) in Shiga toxigenic *Escherichia coli* from livestock sources." *J Clin Microbiol* **41**(8): 3777-3783.
- Granobles Velandia, C. V., A. Krüger, Y. R. Parma, A. E. Parma und P. M. Lucchesi** (2012). "Differences in Shiga toxin and phage production among *stx<sub>2g</sub>*-positive STEC strains." *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 82. doi: 10.3389/fcimb.2012.00082.
- Grif, K., M. P. Dierich, H. Karch und F. Allerberger** (1998). "Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**(11): 761-766.
- Grotiuz, G., A. Sirok, P. Gadea, G. Varela und F. Schelotto** (2006). "Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea." *J Clin Microbiol* **44**(10): 3838-3841.
- Habib, N. F. und M. P. Jackson** (1992). "Identification of a B subunit gene promoter in the Shiga toxin operon of *Shigella dysenteriae* 1." *J Bacteriol* **174**(20): 6498-6507.
- Habib, N. F. und M. P. Jackson** (1993). "Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes." *J Bacteriol* **175**(3): 597-603.



- Harris, S. M., W. F. Yue, S. A. Olsen, J. Hu, W. J. Means, R. J. McCormick, M. Du und M. J. Zhu (2012). "Salt at concentrations relevant to meat processing enhances Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* O157:H7." *Int J Food Microbiol* **159**(3): 186-192.
- Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori und H. Shinagawa (2001). "Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12." *DNA Res* **8**(1): 11-22.
- Herold, S., H. Karch und H. Schmidt (2004). "Shiga toxin-encoding bacteriophages - genomes in motion." *Int J Med Microbiol* **294**(2-3): 115-121.
- Hirst, T. R. und J. Holmgren (1987). "Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7418-7422.
- Hirst, T. R., J. Sanchez, J. B. Kaper, S. J. Hardy und J. Holmgren (1984). "Mechanism of toxin secretion by *Vibrio cholerae* investigated in strains harboring plasmids that encode heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(24): 7752-7756.
- Hoffmann, C. (2010). Entwicklung und Prüfung eines Impfstoffes gegen die Ödemkrankheit der Schweine. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- House, B., J. V. Kus, N. Prayitno, R. Mair, L. Que, F. Chingcuanco, V. Gannon, D. G. Cvitkovitch und D. Barnett Foster (2009). "Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence." *Microbiology* **155**(Pt 9): 2907-2918.
- Hovde, C. J., S. B. Calderwood, J. J. Mekalanos und R. J. Collier (1988). "Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(8): 2568-2572.
- Huang, A., S. de Grandis, J. Friesen, M. Karmali, M. Petric, R. Congi und J. L. Brunton (1986). "Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19." *J Bacteriol* **166**(2): 375-379.
- Huang, A., J. Friesen und J. L. Brunton (1987). "Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-like toxin 1 in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **169**(9): 4308-4312.
- Hübner NO, S. K., Kramer A (2007). "Vergleich von Methoden zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration und Schlussfolgerungen zur Weiterentwicklung der Methoden." *GMS. Krankenhaushyg Interdisziplinär* **2**(2): Doc34.
- Ichinohe, N., Y. Ohara-Nemoto, T. K. Nemoto, S. Kimura und S. Ichinohe (2009). "Effects of fosfomycin on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: quantification of copy numbers of Shiga toxin-encoding genes and their expression levels using real-time PCR." *J Med Microbiol* **58**(Pt 7): 971-973.
- Imamovic, L., E. Balleste, J. Jofre und M. Muniesa (2010a). "Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR." *Appl Environ Microbiol* **76**(17): 5693-5701.
- Imamovic, L., R. Serra-Moreno, J. Jofre und M. Muniesa (2010b). "Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity." *J Appl Microbiol* **108**(3): 1105-1114.
- Imberechts, H., H. U. Bertschinger, M. Stamm, T. Sydler, P. Pohl, H. De Greve, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu und P. Lintermans (1994). "Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea." *Vet Microbiol* **40**(3-4): 219-230.

- Imberechts, H., H. De Greve und P. Lintermans** (1992). "The pathogenesis of edema disease in pigs. A review." *Vet Microbiol* **31**(2-3): 221-233.
- Iordanov, M. S., D. Pribnow, J. L. Magun, T. H. Dinh, J. A. Pearson, S. L. Chen und B. E. Magun** (1997). "Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA." *Mol Cell Biol* **17**(6): 3373-3381.
- Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda und M. Nishibuchi** (1990). "Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome." *Microb Pathog* **8**(1): 47-60.
- Jackson, M. P., R. J. Neill, A. D. O'Brien, R. K. Holmes und J. W. Newland** (1987a). "Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933." *FEMS Microbiol Lett* **44**(1): 109-114.
- Jackson, M. P., J. W. Newland, R. K. Holmes und A. D. O'Brien** (1987b). "Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*." *Microb Pathog* **2**(2): 147-153.
- James, C. E., K. N. Stanley, H. E. Allison, H. J. Flint, C. S. Stewart, R. J. Sharp, J. R. Saunders und A. J. McCarthy** (2001). "Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage." *Appl Environ Microbiol* **67**(9): 4335-4337.
- Jenko, K. L., Y. Zhang, Y. Kostenko, Y. Fan, C. Garcia-Rodriguez, J. Lou, J. D. Marks und S. M. Varnum** (2014). "Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins." *Analyst* **139**(20): 5093-5102.
- Johansen, B. K., Y. Wasteson, P. E. Granum und S. Brynstad** (2001). "Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes." *Microbiology* **147**(Pt 7): 1929-1936.
- Jones, N. L., A. Islur, R. Haq, M. Mascarenhas, M. A. Karmali, M. H. Perdue, B. W. Zanke und P. M. Sherman** (2000). "*Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**(5): G811-819.
- Kanjo, N. und H. Inokuchi** (1999). "Genes for tRNA<sup>Arg</sup> located in the upstream region of the Shiga toxin II operon in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *DNA Res* **6**(1): 71-73.
- Karch, H., H. Schmidt, C. Janetzki-Mittmann, J. Scheef und M. Kröger** (1999). "Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages." *Mol Gen Genet* **262**(4-5): 600-607.
- Karch, H., N. A. Strockbine und A. D. O'Brien** (1986). "Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of Shiga-like toxin producing strains by colony blot assay." *FEMS Microbiol Lett* **35**(2-3): 141-145.
- Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, R. Cheung und G. S. Arbus** (1985). "Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin." *J Clin Microbiol* **22**(4): 614-619.
- Katagiri, Y. U., T. Mori, H. Nakajima, C. Katagiri, T. Taguchi, T. Takeda, N. Kiyokawa und J. Fujimoto** (1999). "Activation of Src family kinase yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains." *J Biol Chem* **274**(49): 35278-35282.

- Kawano, K., M. Okada, T. Haga, K. Maeda und Y. Goto** (2008). "Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**(3): 227-232.
- Keusch, G. T., M. Jacewicz, D. W. Acheson, A. Donohue-Rolfe, A. V. Kane und R. H. McCluer** (1995). "Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for Shiga-like toxin 2e." *Infect Immun* **63**(3): 1138-1141.
- Kim, I. G. und T. J. Oh** (2000). "SOS induction of the *recA* gene by UV-, gamma-irradiation and mitomycin C is mediated by polyamines in *Escherichia coli* K-12." *Toxicol Lett* **116**(1-2): 143-149.
- Kim, S. H., S. H. Ryu, S. H. Lee, Y. H. Lee, S. R. Lee, J. W. Huh, S. U. Kim, E. Kim, S. Kim, S. Jon, R. E. Bishop und K. T. Chang** (2011). "Instability of toxin A subunit of AB<sub>5</sub> toxins in the bacterial periplasm caused by deficiency of their cognate B subunits." *Biochim Biophys Acta* **1808**(10): 2359-2365.
- Kimmitt, P. T., C. R. Harwood und M. R. Barer** (1999). "Induction of type 2 Shiga toxin synthesis in *Escherichia coli* O157 by 4-quinolones." *Lancet* **353**(9164): 1588-1589.
- Kimmitt, P. T., C. R. Harwood und M. R. Barer** (2000). "Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response." *Emerg Infect Dis* **6**(5): 458-465.
- Knippers, R.** (2006). *Molekulare Genetik*. 9<sup>th</sup> edition. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Knöfel, T.** (2000). *Röntgenstrukturanalyse der 5'-Nucleotidase aus *Escherichia coli* mit dinuklearem Metallzentrum*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Koch, C., S. Hertwig und B. Appel** (2003). "Nucleotide sequence of the integration site of the temperate bacteriophage 6220, which carries the Shiga toxin gene *stx*<sub>10x3</sub>." *J Bacteriol* **185**(21): 6463-6466.
- Koch, C., S. Hertwig, R. Lurz, B. Appel und L. Beutin** (2001). "Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx*<sub>10x3</sub> gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans." *J Clin Microbiol* **39**(11): 3992-3998.
- Koch, P.-J.** (1998). *Untersuchungen zur Wechselwirkung von Polymyxin B mit bakteriellen Polysacchariden*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Köhler, B., H. Karch und H. Schmidt** (2000). "Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains." *Microbiology* **146** ( Pt 5): 1085-1090.
- Kolling, G. L. und K. R. Matthews** (1999). "Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7." *Appl Environ Microbiol* **65**(5): 1843-1848.
- Konowalchuk, J., N. Dickie, S. Stavric und J. I. Speirs** (1978). "Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*." *Infect Immun* **22**(3): 644-648.
- Konowalchuk, J., J. I. Speirs und S. Stavric** (1977). "Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*." *Infect Immun* **18**(3): 775-779.
- Konstantinova, L., J. Hamrik, P. Kulich, V. Kummer, J. Maskova und P. Alexa** (2008). "The effect of intramuscular administration of colistin on the development and course of experimentally induced oedema disease in weaned piglets." *Vet Microbiol* **128**(1-2): 160-166.
- Koudelka, A. P., L. A. Hufnagel und G. B. Koudelka** (2004). "Purification and characterization of the repressor of the Shiga toxin-encoding bacteriophage 933W: DNA binding, gene regulation, and autocleavage." *J Bacteriol* **186**(22): 7659-7669.
- Kroker, R.** (2003). *Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. W. Löscher, Fritz R. Ungemach, Reinhard

- Kroker. Berlin/Wien, Parey Buchverlag im Blackwell Verlag GmbH. **6. Auflage:** S. 208-247.
- Kudva, R., K. Denks, P. Kuhn, A. Vogt, M. Müller und H. G. Koch** (2013). "Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways." *Res Microbiol* **164**(6): 505-534.
- Kwan, B. W., N. Chowdhury und T. K. Wood** (2015). Combatting Bacterial Infections by Killing Persister Cells with Mitomycin C. *Environ Microbiol*. doi: 10.1111/1462-2920.12873.
- Lage, A. P., A. Fauconnier, A. Burette, Y. Glupczynski, A. Bollen und E. Godfroid** (1996). "Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified *Helicobacter pylori* DNA in gastric biopsy specimens." *J Clin Microbiol* **34**(3): 530-533.
- Lejeune, J. T., S. T. Abedon, K. Takemura, N. P. Christie und S. Sreevatsan** (2004). "Human *Escherichia coli* O157:H7 genetic marker in isolates of bovine origin." *Emerg Infect Dis* **10**(8): 1482-1485.
- Lesesne, J. B., N. Rothschild, B. Erickson, S. Korec, R. Sisk, J. Keller, M. Arbus, P. V. Woolley, L. Chiazze, P. S. Schein und et al.** (1989). "Cancer-associated hemolytic-uremic syndrome: analysis of 85 cases from a national registry." *J Clin Oncol* **7**(6): 781-789.
- Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim und W. C. Yam** (2003). "A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* **69**(12): 7549-7553.
- Li, P., D. Wu, K. Liu, S. Suolang, T. He, X. Liu, C. Wu, Y. Wang und D. Lin** (2014). "Investigation of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and enterococci isolated from Tibetan pigs." *PLoS One* **9**(4): e95623.
- Linggood, M. A. und J. M. Thompson** (1987). "Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease." *J Med Microbiol* **24**(4): 359-362.
- Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis und M. Karmali** (1987). "Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*." *J Biol Chem* **262**(18): 8834-8839.
- Little, J. W. und D. W. Mount** (1982). "The SOS regulatory system of *Escherichia coli*." *Cell* **29**(1): 11-22.
- Livny, J. und D. I. Friedman** (2004). "Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system." *Mol Microbiol* **51**(6): 1691-1704.
- Łoś, J. M., M. Łoś, A. Węgrzyn und G. Węgrzyn** (2010). "Hydrogen peroxide-mediated induction of the Shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in *Escherichia coli* O157:H7." *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**(3): 322-329.
- Lowe, R. M., D. Baines, L. B. Selinger, J. E. Thomas, T. A. McAllister und R. Sharma** (2009). "*Escherichia coli* O157:H7 strain origin, lineage, and Shiga toxin 2 expression affect colonization of cattle." *Appl Environ Microbiol* **75**(15): 5074-5081.
- Lown, J. W., A. Begleiter, D. Johnson und A. R. Morgan** (1976). "Studies related to antitumor antibiotics. Part V. Reactions of mitomycin C with DNA examined by ethidium fluorescence assay." *Can J Biochem* **54**(2): 110-119.
- Luhof, G., A. Böttner, H. M. Hafez, M. Kaske, C. Kehrenberg, M. Kietzmann, D. Klarmann, G. Klein, P. Krabisch, T. Kühn, A. Richter, C. Sigge, W. Traeder, K. H. Waldmann, J. Wallmann, C. Werckenthin und S. Schwarz** (2004). "Proposals of the working group "Antibiotic resistance" for the configuration of microtitre plates to be used in routine antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens from infections of large food-producing animals and mastitis cases." *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* **117**(7-8): 245-251.

- MacLeod, D. L. und C. L. Gyles** (1989). "Effects of culture conditions on yield of Shiga-like toxin-IIv from *Escherichia coli*." Can J Microbiol **35**(6): 623-629.
- MacLeod, D. L. und C. L. Gyles** (1990). "Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant." Infect Immun **58**(5): 1232-1239.
- Mainil, J.** (1999). "Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals." Vet Res **30**(2-3): 235-257.
- Makino, K., K. Yokoyama, Y. Kubota, C. H. Yutsudo, S. Kimura, K. Kurokawa, K. Ishii, M. Hattori, I. Tatsuno, H. Abe, T. Iida, K. Yamamoto, M. Onishi, T. Hayashi, T. Yasunaga, T. Honda, C. Sasakawa und H. Shinagawa** (1999). "Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak." Genes Genet Syst **74**(5): 227-239.
- Manning, S. D.** (2014). "www.shigatox.net." Zugriff am 06.08.2014, <http://www.shigatox.net/new/>.
- Marques, L. R., M. A. Moore, J. G. Wells, I. K. Wachsmuth und A. D. O'Brien** (1986). "Production of Shiga-like toxin by *Escherichia coli*." J Infect Dis **154**(2): 338-341.
- Marques, L. R. M., J. S. M. Peiris, S. J. Cryz und A. D. O'Brien** (1987). "*Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II." FEMS Microbiol Lett **44**: 33-38.
- Martin, D. L., K. L. MacDonald, K. E. White, J. T. Soler und M. T. Osterholm** (1990). "The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota." N Engl J Med **323**(17): 1161-1167.
- Mateu, E. und M. Martin** (2000). "Antimicrobial resistance in enteric porcine *Escherichia coli* strains in Spain." Vet Rec **146**(24): 703-705.
- Matise, I., T. Sirinarumitr, B. T. Bosworth und H. W. Moon** (2000). "Vascular ultrastructure and DNA fragmentation in swine infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*." Vet Pathol **37**(4): 318-327.
- Matsushiro, A., K. Sato, H. Miyamoto, T. Yamamura und T. Honda** (1999). "Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin." J Bacteriol **181**(7): 2257-2260.
- Maurer, C., C. Lazizzera und J. Y. Madec** (2008). "Characterization of inducible *stx*<sub>2</sub>-positive *Escherichia coli* O157:H7/H7- strains isolated from cattle in France." J Appl Microbiol **104**(6): 1569-1576.
- Maurer, C., D. Meunier und J. Y. Madec** (2009). "Shiga toxin Stx2 production is promoted by enrofloxacin in experimental *in vitro*-selected mutants of *Escherichia coli* O157:H7 resistant to fluoroquinolones." Foodborne Pathog Dis **6**(2): 257-259.
- McDonald, J. E., D. L. Smith, P. C. Fogg, A. J. McCarthy und H. E. Allison** (2010). "High-throughput method for rapid induction of prophages from lysogens and its application in the study of Shiga Toxin-encoding *Escherichia coli* strains." Appl Environ Microbiol **76**(7): 2360-2365.
- McDonough, M. A. und J. R. Butterton** (1999). "Spontaneous tandem amplification and deletion of the Shiga toxin operon in *Shigella dysenteriae* 1." Mol Microbiol **34**(5): 1058-1069.
- McGannon, C. M., C. A. Fuller und A. A. Weiss** (2010). "Different classes of antibiotics differentially influence Shiga toxin production." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3790-3798.
- Meisen, I., R. Rosenbrück, H. J. Galla, S. Hüwel, I. U. Kouzel, M. Mormann, H. Karch und J. Müthing** (2013). "Expression of Shiga toxin 2e glycosphingolipid receptors of primary porcine brain endothelial cells and toxin-mediated breakdown of the blood-brain barrier." Glycobiology **23**(6): 745-759.

- Miksits, K., Helmut Hahn** (2004). Antimikrobielle Chemotherapie. Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Verlag. **3. Auflage:** S. 317.
- Miller, C., L. E. Thomsen, C. Gaggero, R. Mosseri, H. Ingmer und S. N. Cohen** (2004). "SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality." *Science* **305**(5690): 1629-1631.
- Miyamoto, H., W. Nakai, N. Yajima, A. Fujibayashi, T. Higuchi, K. Sato und A. Matsushiro** (1999). "Sequence analysis of Stx2-converting phage VT2-Sa shows a great divergence in early regulation and replication regions." *DNA Res* **6**(4): 235-240.
- Mohsin, M., A. Haque, A. Ali, Y. Sarwar, S. Bashir, A. Tariq, A. Afzal, T. Iftikhar und M. A. Saeed** (2010). "Effects of ampicillin, gentamicin, and cefotaxime on the release of Shiga toxins from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated during a diarrhea episode in Faisalabad, Pakistan." *Foodborne Pathog Dis* **7**(1): 85-90.
- Morita, H., H. Yoshikawa, T. Suzuki, S. Hisamatsu, Y. Kato, R. Sakata, Y. Nagata und T. Yoshimura** (2004). "Anti-microbial action against verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 of nitric oxide derived from sodium nitrite." *Biosci Biotechnol Biochem* **68**(5): 1027-1034.
- Moxley, R. A.** (2000). "Edema disease." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **16**(1): 175-185.
- Mühldorfer, I., J. Hacker, G. T. Keusch, D. W. Acheson, H. Tschäpe, A. V. Kane, A. Ritter, T. Ölschläger und A. Donohue-Rolfe** (1996). "Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*." *Infect Immun* **64**(2): 495-502.
- Müthing, J., I. Meisen, W. Zhang, M. Bielaszewska, M. Mormann, R. Bauerfeind, M. A. Schmidt, A. W. Friedrich und H. Karch** (2012). "Promiscuous Shiga toxin 2e and its intimate relationship to Forssman." *Glycobiology* **22**(6): 849-862.
- Muniesa, M., J. E. Blanco, M. De Simon, R. Serra-Moreno, A. R. Blanch und J. Jofre** (2004a). "Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle." *Microbiology* **150**(Pt 9): 2959-2971.
- Muniesa, M., M. de Simon, G. Prats, D. Ferrer, H. Panella und J. Jofre** (2003). "Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak." *Infect Immun* **71**(8): 4554-4562.
- Muniesa, M., J. Recktenwald, M. Bielaszewska, H. Karch und H. Schmidt** (2000). "Characterization of a Shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin." *Infect Immun* **68**(9): 4850-4855.
- Muniesa, M., R. Serra-Moreno und J. Jofre** (2004b). "Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* genes appeared conserved." *Environ Microbiol* **6**(7): 716-725.
- Murakami, J., K. Kishi, K. Hirai, K. Hiramatsu, T. Yamasaki und M. Nasu** (2000). "Macrolides and clindamycin suppress the release of Shiga-like toxins from *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro*." *Int J Antimicrob Agents* **15**(2): 103-109.
- Nakao, H., K. Kimura, H. Murakami, T. Maruyama und T. Takeda** (2002). "Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan." *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**(4): 289-297.
- Neely, M. N. und D. I. Friedman** (1998). "Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of Shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release." *Mol Microbiol* **28**(6): 1255-1267.
- Nevo-Koch, E.** (2010). Untersuchungen zur antikanzerogenen Wirkung des Weinrebenextraktes Vineatrol®30 und der darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- O'Brien, A. D. und R. K. Holmes** (1987). "Shiga and Shiga-like toxins." *Microbiol Rev* **51**(2): 206-220.

- O'Brien, A. D. und G. D. Laveck** (1982). "Immunochemical and cytotoxic activities of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) and Shiga-like toxins." *Infect Immun* **35**(3): 1151-1154.
- O'Brien, A. D. und G. D. LaVeck** (1983). "Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*." *Infect Immun* **40**(2): 675-683.
- O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, M. R. Thompson und S. B. Formal** (1982). "Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*." *J Infect Dis* **146**(6): 763-769.
- O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith und S. B. Formal** (1984). "Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea." *Science* **226**(4675): 694-696.
- O'Loughlin, E. V. und R. M. Robins-Browne** (2001). "Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells." *Microbes Infect* **3**(6): 493-507.
- Oanh, T. K., V. K. Nguyen, T. N. Do, B. M. Goddeeris und H. De Greve** (2010). "*Escherichia coli* strains causing edema disease in northern Vietnam share an identical verotoxin 2e." *Trop Anim Health Prod* **42**(8): 1797-1804.
- Obrig, T. G., T. P. Moran und J. E. Brown** (1987). "The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis." *Biochem J* **244**(2): 287-294.
- Ochoa, T. J., J. Chen, C. M. Walker, E. Gonzales und T. G. Cleary** (2007). "Rifaximin does not induce toxin production or phage-mediated lysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(8): 2837-2841.
- Ogasawara, T., K. Ito, K. Igarashi, T. Yutsudo, N. Nakabayashi und Y. Takeda** (1988). "Inhibition of protein synthesis by a Vero toxin (VT2 or Shiga-like toxin II) produced by *Escherichia coli* O157:H7 at the level of elongation factor 1-dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes." *Microb Pathog* **4**(2): 127-135.
- Ohara, T., S. Kojio, I. Taneike, S. Nakagawa, F. Gondaira, Y. Tamura, F. Gejyo, H. M. Zhang und T. Yamamoto** (2002). "Effects of azithromycin on Shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11): 3478-3483.
- Ohmura-Hoshino, M., S. T. Ho, H. Kurazono, K. Igarashi, S. Yamasaki und Y. Takeda** (2003). "Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga toxin 1 from bovine *Escherichia coli* strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin." *Microbiol Immunol* **47**(10): 717-725.
- Oloomi, M., S. Bouzari und M. Arshadi** (2006). "N-terminus leader sequence of Shiga toxin (Stx) 1 is essential for production of active recombinant protein in *E. coli*." *Protein Pept Lett* **13**(5): 509-512.
- Orth, D., K. Grif, A. B. Khan, A. Naim, M. P. Dierich und R. Würzner** (2007). "The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin *in vitro* correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome." *Diagn Microbiol Infect Dis* **59**(3): 235-242.
- Ostroff, S. M., P. I. Tarr, M. A. Neill, J. H. Lewis, N. Hargrett-Bean und J. M. Kobayashi** (1989). "Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections." *J Infect Dis* **160**(6): 994-998.
- Pachner, A. R., K. Amemiya, E. Delaney, T. O'Neill, C. A. Hughes und W. F. Zhang** (1997). "Interleukin-6 is expressed at high levels in the CNS in Lyme neuroborreliosis." *Neurology* **49**(1): 147-152.
- Panos, G. Z., G. I. Betsi und M. E. Falagas** (2006). "Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection?" *Aliment Pharmacol Ther* **24**(5): 731-742.
- Parma, Y. R., P. A. Chacana, P. M. Lucchesi, A. Roge, C. V. Granobles Velandia, A. Krüger, A. E. Parma und M. E. Fernandez-Miyakawa** (2012). "Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

- using chicken egg yolk IgY antibodies." *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 84. doi: 10.3389/fcimb.2012.00084.
- Paton, A. W., L. Beutin und J. C. Paton** (1995). "Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons." *Gene* **153**(1): 71-74.
- Paton, A. W. und J. C. Paton** (1996). "*Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome." *J Clin Microbiol* **34**(2): 463-465.
- Paton, A. W., J. C. Paton, M. W. Heuzenroeder, P. N. Goldwater und P. A. Manning** (1992). "Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome." *Microb Pathog* **13**(3): 225-236.
- Paton, J. C. und A. W. Paton** (1998). "Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections." *Clin Microbiol Rev* **11**(3): 450-479.
- Pavia, A. T., C. R. Nichols, D. P. Green, R. V. Tauxe, S. Mottice, K. D. Greene, J. G. Wells, R. L. Siegler, E. D. Brewer, D. Hannon und et al.** (1990). "Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations." *J Pediatr* **116**(4): 544-551.
- Pedersen, M. G., C. Hansen, E. Riise, S. Persson und K. E. Olsen** (2008). "Subtype-specific suppression of Shiga toxin 2 released from *Escherichia coli* upon exposure to protein synthesis inhibitors." *J Clin Microbiol* **46**(9): 2987-2991.
- Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamouis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch und F. R. Blattner** (2001). "Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Nature* **409**(6819): 529-533.
- Persson, S., K. E. Olsen, S. Ethelberg und F. Scheutz** (2007). "Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations." *J Clin Microbiol* **45**(6): 2020-2024.
- Pierard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens und S. Lauwers** (1998). "Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates." *J Clin Microbiol* **36**(11): 3317-3322.
- Plunkett, G., 3rd, D. J. Rose, T. J. Durfee und F. R. Blattner** (1999). "Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product." *J Bacteriol* **181**(6): 1767-1778.
- Pradel, N., C. Ye, V. Livrelli, J. Xu, B. Joly und L. F. Wu** (2003). "Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Infect Immun* **71**(9): 4908-4916.
- Probert, W. S., C. McQuaid und K. Schrader** (2014). "Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1." *J Clin Microbiol* **52**(7): 2346-2351.
- Pulz, M., A. Matussek, M. Monazahian, A. Tittel, E. Nikolic, M. Hartmann, T. Bellin, J. Buer und F. Gunzer** (2003). "Comparison of a Shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens." *J Clin Microbiol* **41**(10): 4671-4675.
- Rastogi, R. P., Richa, A. Kumar, M. B. Tyagi und R. P. Sinha** (2010). "Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair." *J Nucleic Acids* **2010**: Article ID 592980, doi: 10.4061/2010/592980.



- Recktenwald, J. und H. Schmidt** (2002). "The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage  $\phi$ P27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved." *Infect Immun* **70**(4): 1896-1908.
- Ritchie, J. M., P. L. Wagner, D. W. Acheson und M. K. Waldor** (2003). "Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates." *Appl Environ Microbiol* **69**(2): 1059-1066.
- Roca, A. I. und M. M. Cox** (1997). "RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **56**: 129-223.
- Rozanov, D. V., R. D'Ari und S. P. Sineoky** (1998). "RecA-independent pathways of lambdoid prophage induction in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **180**(23): 6306-6315.
- Sakagami, Y., R. Ichise, K. Kajimura und H. Yokoyama** (1999). "Inhibitory effect of creosote and its main components on production of verotoxin of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Lett Appl Microbiol* **28**(2): 118-120.
- Salimetrics** (2014) "Inter- and Intra-Assay Coefficients of Variability." [http://www.salimetrics.com/assets/documents/Spit\\_Tips\\_-\\_Inter\\_\\_Intra\\_Assay\\_Coefficients\\_of\\_Variability.pdf](http://www.salimetrics.com/assets/documents/Spit_Tips_-_Inter__Intra_Assay_Coefficients_of_Variability.pdf), Abruf am 08.11.2014.
- Salvadori, M. R., A. T. Yamada und T. Yano** (2001). "Morphological and intracellular alterations induced by cytotoxin VT2y produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome." *FEMS Microbiol Lett* **197**(1): 79-84.
- Sambrook, J., F. Fritsch und T. Maniatis** (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbour, USA.
- Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg und H. C. Krivan** (1990). "Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants." *Infect Immun* **58**(3): 611-618.
- Sandvig, K.** (2001). "Shiga toxins." *Toxicon* **39**(11): 1629-1635.
- Sandvig, K., S. Grimmer, S. U. Lauvrak, M. L. Torgersen, G. Skretting, B. van Deurs und T. G. Iversen** (2002). "Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells." *Histochem Cell Biol* **117**(2): 131-141.
- Sandvig, K. und B. van Deurs** (1996). "Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin." *Physiol Rev* **76**(4): 949-966.
- Sato, T., T. Shimizu, M. Watarai, M. Kobayashi, S. Kano, T. Hamabata, Y. Takeda und S. Yamasaki** (2003a). "Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages." *Gene* **309**(1): 35-48.
- Sato, T., T. Shimizu, M. Watarai, M. Kobayashi, S. Kano, T. Hamabata, Y. Takeda und S. Yamasaki** (2003b). "Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages." *J Bacteriol* **185**(13): 3966-3971.
- Scheutz, F., L. D. Teel, L. Beutin, D. Pierard, G. Buvens, H. Karch, A. Mellmann, A. Caprioli, R. Tozzoli, S. Morabito, N. A. Strockbine, A. R. Melton-Celsa, M. Sanchez, S. Persson und A. D. O'Brien** (2012). "Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature." *J Clin Microbiol* **50**(9): 2951-2963.
- Schmidt, H.** (2001). "Shiga-toxin-converting bacteriophages." *Res Microbiol* **152**(8): 687-695.
- Schmidt, H., M. Bielaszewska und H. Karch** (1999). "Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage  $\phi$ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7." *Appl Environ Microbiol* **65**(9): 3855-3861.
- Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemühl, J. Heesemann und H. Karch** (1993). "Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples." *Infect Immun* **61**(2): 534-543.

- Schmidt, H., J. Scheef, C. Janetzki-Mittmann, M. Datz und H. Karch** (1997). "An *ileX* tRNA gene is located close to the Shiga toxin II operon in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains." *FEMS Microbiol Lett* **149**(1): 39-44.
- Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler und H. Karch** (2000). "A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons." *Appl Environ Microbiol* **66**(3): 1205-1208.
- Schmitt, C. K., M. L. McKee und A. D. O'Brien** (1991). "Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511." *Infect Immun* **59**(3): 1065-1073.
- Scotland, S. M., H. R. Smith und B. Rowe** (1985). "Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157." *Lancet* **326**(8460): 885-886.
- Scotland, S. M., H. R. Smith, G. A. Willshaw und B. Rowe** (1983). "Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage." *Lancet* **2**(8343): 216.
- Serra-Moreno, R., J. Jofre und M. Muniesa** (2007). "Insertion site occupancy by *stx*<sub>2</sub> bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome." *J Bacteriol* **189**(18): 6645-6654.
- Serra-Moreno, R., J. Jofre und M. Muniesa** (2008). "The CI repressors of Shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of Shiga toxin 2." *J Bacteriol* **190**(13): 4722-4735.
- Shi, T. und D. I. Friedman** (2001). "The operator-early promoter regions of Shiga-toxin bearing phage H-19B." *Mol Microbiol* **41**(3): 585-599.
- Shimizu, T., S. Kawakami, T. Sato, T. Sasaki, M. Higashide, T. Hamabata, T. Ohta und M. Noda** (2007). "The serine 31 residue of the B subunit of Shiga toxin 2 is essential for secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Infect Immun* **75**(5): 2189-2200.
- Shimizu, T., Y. Ohta und M. Noda** (2009). "Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms." *Infect Immun* **77**(7): 2813-2823.
- Sifin** (2015). Produktliste 2015.
- Silverman, J. M., Y. R. Brunet, E. Cascales und J. D. Mougous** (2012). "Structure and regulation of the type VI secretion system." *Annu Rev Microbiol* **66**: 453-472.
- Singh, G.** (2006). "Determination of Cutoff score for a diagnostic test." *The Internet Journal of Laboratory Medicine* **2**(1): <http://ispub.com/IJLM/2/1/9884>, Abruf am 29.09.2014 um 17:54.
- Smith, H. R., S. M. Scotland, G. A. Willshaw, C. Wray, I. M. McLaren, T. Cheasty und B. Rowe** (1988). "Vero cytotoxin production and presence of VT genes in *Escherichia coli* strains of animal origin." *J Gen Microbiol* **134**(3): 829-834.
- Smith, H. W., P. Green und Z. Parsell** (1983). "Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs." *J Gen Microbiol* **129**(10): 3121-3137.
- Smith, H. W. und M. A. Linggood** (1971). "The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*." *J Med Microbiol* **4**(3): 301-305.
- Speirs, J. I. und M. Akhtar** (1991). "Detection of *Escherichia coli* cytotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays." *Can J Microbiol* **37**(8): 650-653.
- Stahlmann, R., Hartmut Lode** (2001a). Antibiotika und Chemotherapeutika. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. W. Forth, Dietrich Henschler, Walter Rummel, Ulrich Förstermann, Klaus Starke. München, Urban & Fischer. **8. Auflage**: S. 862.

- Stahlmann, R., Hartmut Lode** (2001b). Antibiotika und Chemotherapeutika. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. W. Forth, Dietrich Henschler, Walter Rummel, Ulrich Förstermann, Klaus Starke. München, Urban & Fischer. **8. Auflage:** S. 841-849.
- Stathopoulos, C., D. R. Hendrixson, D. G. Thanassi, S. J. Hultgren, J. W. St Geme, 3rd und R. Curtiss, 3rd** (2000). "Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story." *Microbes Infect* **2**(9): 1061-1072.
- Strauch, E., J. A. Hammerl, A. Konietzny, S. Schneiker-Bekel, W. Arnold, A. Goesmann, A. Pühler und L. Beutin** (2008). "Bacteriophage 2851 is a prototype phage for dissemination of the Shiga toxin variant gene 2c in *Escherichia coli* O157:H7." *Infect Immun* **76**(12): 5466-5477.
- Strauch, E., R. Lurz und L. Beutin** (2001). "Characterization of a Shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*." *Infect Immun* **69**(12): 7588-7595.
- Strauch, E., C. Schaudinn und L. Beutin** (2004). "First-time isolation and characterization of a bacteriophage encoding the Shiga toxin 2c variant, which is globally spread in strains of *Escherichia coli* O157." *Infect Immun* **72**(12): 7030-7039.
- Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes und A. D. O'Brien** (1988). "Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1." *J Bacteriol* **170**(3): 1116-1122.
- Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes und A. D. O'Brien** (1986). "Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities." *Infect Immun* **53**(1): 135-140.
- Sugita-Konishi, Y., Y. Hara-Kudo, F. Amano, T. Okubo, N. Aoi, M. Iwaki und S. Kumagai** (1999). "Epigallocatechin gallate and gallic acid inhibit extracellular release of Vero toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Biochim Biophys Acta* **1472**(1-2): 42-50.
- Sung, L. M., M. P. Jackson, A. D. O'Brien und R. K. Holmes** (1990). "Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **172**(11): 6386-6395.
- Suzuki, A., H. Doi, F. Matsuzawa, S. Aikawa, K. Takiguchi, H. Kawano, M. Hayashida und S. Ohno** (2000). "Bcl-2 antiapoptotic protein mediates verotoxin II-induced cell death: possible association between bcl-2 and tissue failure by *E. coli* O157:H7." *Genes Dev* **14**(14): 1734-1740.
- Suzuki, H. und W. W. Kilgore** (1967). "Effects of mitomycin C on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **93**(2): 675-682.
- Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama und K. Tsukamoto** (1986). "An improved colorimetric assay for interleukin 2." *J Immunol Methods* **93**(2): 157-165.
- Takahashi, K., K. Narita, Y. Kato, T. Sugiyama, N. Koide, T. Yoshida und T. Yokochi** (1997). "Low-level release of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and endotoxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* treated with imipenem." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(10): 2295-2296.
- Tamang, M. D., M. Gurung, H. M. Nam, D. C. Moon, G. C. Jang, S. C. Jung und S. K. Lim** (2014). "Antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from healthy and diseased pigs in Korea." *J Food Prot* **77**(9): 1481-1486.
- Taylor, E. V., X. Shi, M. J. Alam, G. Peterson, S. K. Narayanan, D. G. Renter und T. G. Nagaraja** (2011). "Genetic Variations in Shiga Toxin-Producing Abilities of Bovine and Human *Escherichia coli* O157:H7." *Zoonoses Public Health* **58**(3): 185-191.

- Teel, L. D., A. R. Melton-Celsa, C. K. Schmitt und A. D. O'Brien** (2002). "One of two copies of the gene for the activatable Shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage." *Infect Immun* **70**(8): 4282-4291.
- Tesh, V. L., J. A. Burris, J. W. Owens, V. M. Gordon, E. A. Wadolkowski, A. D. O'Brien und J. E. Samuel** (1993). "Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice." *Infect Immun* **61**(8): 3392-3402.
- Toth, I., H. Schmidt, M. Dow, A. Malik, E. Oswald und B. Nagy** (2003). "Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system." *Appl Environ Microbiol* **69**(12): 7242-7247.
- Tu, W., K. Cai, X. Gao, L. Xiao, R. Chen, J. Shi, H. Liu, X. Hou, Q. Wang und H. Wang** (2009). "Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system." *Protein Expr Purif* **67**(2): 169-174.
- Tyler, J. S., M. J. Mills und D. I. Friedman** (2004). "The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression." *J Bacteriol* **186**(22): 7670-7679.
- Tyrrell, G. J., K. Ramotar, B. Toye, B. Boyd, C. A. Lingwood und J. L. Brunton** (1992). "Alteration of the carbohydrate binding specificity of verotoxins from Gal alpha 1-4Gal to GalNAc beta 1-3Gal alpha 1-4Gal and vice versa by site-directed mutagenesis of the binding subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(2): 524-528.
- Tzschoppe, M., A. Martin und L. Beutin** (2012). "A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables." *Int J Food Microbiol* **152**(1-2): 19-30.
- Uemura, R., M. Sueyoshi, M. Nagayoshi und H. Nagatomo** (2003). "Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan." *Microbiol Immunol* **47**(1): 57-61.
- Uemura, R., M. Sueyoshi, Y. Taura und H. Nagatomo** (2004). "Effect of antimicrobial agents on the production and release of Shiga toxin by enterotoxaemic *Escherichia coli* isolates from pigs." *J Vet Med Sci* **66**(8): 899-903.
- Unkmeir, A. und H. Schmidt** (2000). "Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains." *Infect Immun* **68**(9): 4856-4864.
- Vareille, M., T. de Sablet, T. Hindre, C. Martin und A. P. Gobert** (2007). "Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10199-10204.
- Verweij, J. und H. M. Pinedo** (1990). "Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations." *Anticancer Drugs* **1**(1): 5-13.
- Waddell, T., S. Head, M. Petric, A. Cohen und C. Lingwood** (1988). "Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2." *Biochem Biophys Res Commun* **152**(2): 674-679.
- Waddell, T. E., C. A. Lingwood und C. L. Gyles** (1996). "Interaction of verotoxin 2e with pig intestine." *Infect Immun* **64**(5): 1714-1719.
- Wagner, P. L., D. W. Acheson und M. K. Waldor** (1999). "Isogenic lysogens of diverse Shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of Shiga toxin." *Infect Immun* **67**(12): 6710-6714.
- Wagner, P. L., D. W. Acheson und M. K. Waldor** (2001b). "Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Infect Immun* **69**(3): 1934-1937.

- Wagner, P. L., J. Livny, M. N. Neely, D. W. Acheson, D. I. Friedman und M. K. Waldor** (2002). "Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **44**(4): 957-970.
- Wagner, P. L., M. N. Neely, X. Zhang, D. W. Acheson, M. K. Waldor und D. I. Friedman** (2001a). "Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain." *J Bacteriol* **183**(6): 2081-2085.
- Wagner, P. L. und M. K. Waldor** (2002). "Bacteriophage control of bacterial virulence." *Infect Immun* **70**(8): 3985-3993.
- Waldor, M. K. und D. I. Friedman** (2005). "Phage regulatory circuits and virulence gene expression." *Curr Opin Microbiol* **8**(4): 459-465.
- Walterspiel, J. N., S. Ashkenazi, A. L. Morrow und T. G. Cleary** (1992). "Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I." *Infection* **20**(1): 25-29.
- Watarai, M., T. Sato, M. Kobayashi, T. Shimizu, S. Yamasaki, T. Tobe, C. Sasakawa und Y. Takeda** (1998). "Identification and characterization of a newly isolated Shiga toxin 2-converting phage from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*." *Infect Immun* **66**(9): 4100-4107.
- Weinstein, D. L., R. K. Holmes und A. D. O'Brien** (1988a). "Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*." *Infect Immun* **56**(1): 106-111.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, L. P. Perera, R. K. Holmes und A. D. O'Brien** (1989). "In vivo formation of hybrid toxins comprising Shiga toxin and the Shiga-like toxins and role of the B subunit in localization and cytotoxic activity." *Infect Immun* **57**(12): 3743-3750.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes und A. D. O'Brien** (1988b). "Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine." *J Bacteriol* **170**(9): 4223-4230.
- Wieler, L. H., R. Bauerfeind und G. Baljer** (1992). "Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea." *Zentralbl Bakteriol* **276**(2): 243-253.
- Willford, J., K. Mills und L. D. Goodridge** (2009). "Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin." *J Food Prot* **72**(4): 741-747.
- Wong, C. S., S. Jelacic, R. L. Habeeb, S. L. Watkins und P. I. Tarr** (2000). "The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections." *N Engl J Med* **342**(26): 1930-1936.
- Yamamoto, T., Ikue Taneike, Yukiko Tamura, Jun-ichiro Nishi, Kiyoshi Kawakami** (2000). "A novel hemagglutinin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O86:NM associated with hemolytic uremic syndrome in a child." *Acta Medica and Biologica* **48**(4): 147-152.
- Yamamoto, T., S. Kojio, I. Taneike, S. Nakagawa, N. Iwakura und N. Wakisaka-Saito** (2003). "<sup>60</sup>Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage." *FEMS Microbiol Lett* **222**(1): 115-121.
- Yan, Y., Y. Shi, D. Cao, X. Meng, L. Xia und J. Sun** (2011). "Prevalence of Stx Phages in Environments of a Pig Farm and Lysogenic Infection of the Field *E. coli* O157 Isolates with a Recombinant Converting Phage." *Curr Microbiol* **62**(2): 458-464.
- Yoh, M., E. K. Frimpong und T. Honda** (1997). "Effect of antimicrobial agents, especially fosfomycin, on the production and release of Vero toxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**(1): 57-64.
- Yoh, M., E. K. Frimpong, S. P. Voravuthikunchai und T. Honda** (1999). "Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Can J Microbiol* **45**(9): 732-739.

- Yokoyama, K., T. Horii, T. Yamashino, S. Hashikawa, S. Barua, T. Hasegawa, H. Watanabe und M. Ohta** (2000a). "Production of Shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins." *FEMS Microbiol Lett* **192**(1): 139-144.
- Yokoyama, K., K. Makino, Y. Kubota, M. Watanabe, S. Kimura, C. H. Yutsudo, K. Kurokawa, K. Ishii, M. Hattori, I. Tatsuno, H. Abe, M. Yoh, T. Iida, M. Ohnishi, T. Hayashi, T. Yasunaga, T. Honda, C. Sasakawa und H. Shinagawa** (2000b). "Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak." *Gene* **258**(1-2): 127-139.
- Zhang, Q., A. Donohue-Rolfe, G. Krautz-Peterson, M. Sevo, N. Parry, C. Abeijon und S. Tzipori** (2009). "Gnotobiotic piglet infection model for evaluating the safe use of antibiotics against *Escherichia coli* O157:H7 infection." *J Infect Dis* **199**(4): 486-493.
- Zhang, W., M. Bielaszewska, A. W. Friedrich, T. Kuczius und H. Karch** (2005). "Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* **71**(1): 558-561.
- Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius und H. Karch** (2002). "Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx*<sub>1c</sub>) in *Escherichia coli* strains isolated from humans." *J Clin Microbiol* **40**(4): 1441-1446.
- Zhang, X., A. D. McDaniel, L. E. Wolf, G. T. Keusch, M. K. Waldor und D. W. Acheson** (2000). "Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice." *J Infect Dis* **181**(2): 664-670.
- Zhang, Y., C. Laing, Z. Zhang, J. Hallewell, C. You, K. Ziebell, R. P. Johnson, A. M. Kropinski, J. E. Thomas, M. Karmali und V. P. Gannon** (2010). "Lineage and host source are both correlated with levels of Shiga toxin 2 production by *Escherichia coli* O157:H7 strains." *Appl Environ Microbiol* **76**(2): 474-482.

## 9 Anhang

### 9.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 31: Verwendete Geräte**

Gerät/Modell	Firma
Autoklav FVS/2	Fa. Federgari, Albuzzano, Italien
Autoklav Tuttnauer Systec 3870	Fa. Systec GmbH, Wettenberg
Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. 429K	Fa. Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Brutschrank Typ BB 6220 CU	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eismaschine Scotsman AF 80 AS	über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
elektrische Pumpe, easy-load Masterflex®	Fa. Millipore GmbH, Eschborn
Elektrophoresekammer für Agarosegele (100 ml) (Electro 4)	Fa. HYBAID GmbH, Heidelberg
ELISA-Platten-Waschvorrichtung Costar® Transtar-96	Fa. Corning Inc., NY, USA, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Feinwaage AE 163	Fa. Mettler-Waagen GmbH, Gießen
Feinwaage EW600-2M	Fa. Kern, Albstadt
Gefrierschrank -20 °C GST2600	Fa. Bosch, Jungingen
Gefrierschrank -70 °C Herafreeze Cat.No. 77608225	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inkubator Typ VY 5042 EK	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inversmikroskop LABOVERT FS	Fa. Leitz, Wetzlar
Kühlschrank	Fa. Bosch, Jungingen
Magnetrührer IKA COMBIMAG RED	Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, Staufen
Mehrkanalpipette elektrisch e300, 10 - 300 µl	Fa. Biohit Deutschland GmbH, Rosbach v. d. Höhe
Mehrkanalpipette Titertek Digital Multichannel Pipette 50 - 200 µl	Fa. Titertek Inc., Huntsville, U.S.A., über Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Mehrkanalpipette Research 2 - 200 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipette Research 30 - 300 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Microprocessor pH-Meter pH537 mit Elektrode SenTix 41	Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mikrotiterplattenspiegel	Fa. Titertek Inc., Huntsville, U.S.A., über Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Mikrowellengerät	Fa. Durabrand

Fortsetzung der **Tabelle 31** auf der nächsten Seite

Gerät/Modell	Firma
Multistepper 50/100/150/200 µl	Fa. Titertek Inc., Huntsville, U.S.A. über Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1000 mm; 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Photometer Typ DU® 640	Fa. Beckman Instruments GmbH, München
Pipetten Reference 0,5 - 10 µl/10 - 100 µl/100 - 1000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe acuboy	Fa. Tecnomara, jetzt Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Plattenphotometer Titertek Multiscan Ascent 354	Fa. Titertek Inc., Huntsville, U.S.A. über Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Reinwasseranlage Seralpur PRO 90CN	Fa. Seral, Ransbach-Baumbach
Schüttelbrutschrank (Modelle 3032 und 3033)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Schüttelplatte „Assistent 348/1“	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Sicherheitswerkbank Gelaire Laminar Air Flow Class 100	Fa. ICN Biomedicals S. p. A., Rom, Italien
Sterilbank LaminAir HB 2472 (ZKI)	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler TGradient 96	Fa. Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler T1	Fa. Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 20	Fa. Hettich, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Tischzentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf, Hamburg
Über-Kopf-Schüttler für Reaktionsgefäße REAX 104	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disrupter & Schallkopf, ½-Titan-Resonator Sonifier B15	Fa. G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
UV-Kammer Stratalinker 1800	Fa. Stratagene, La Jolla, U.S.A.
UV-Bildanalyse-Tisch, UVT-20 M/W, Cat.No. 2975100	Fa. Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Vortex-Gerät Mini-Shaker MS2	Fa. IKA Werke GmbH, Staufen
Wasserbad Typ W200	Fa. Memmert GmbH und Co. KG, Schwalbach
Wippe	Eigenbau der Institutswerkstatt
Zentrifuge 5804R, Rotor A-4-44	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Sigma 4K15C, Rotor Nr. 11150	Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz



**Tabelle 32: Verwendete Chemikalien**

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Agarose	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11404
Amoxicillin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	A8523
Bacto™-Agar	Fa. Becton Dickinson GmbH, über Otto Nordwald GmbH, Hamburg	214030
Bacto™-Tryptone	Fa. Becton Dickinson GmbH, über Otto Nordwald GmbH, Hamburg	211705
Bariumchlorid-dihydrat, $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1719
BCA-Protein-Assay Kit	Fa. Pierce, Rockford, Illinois, USA	23225
Benzonase® Nuclease	Fa. Novagen, über VWR, Darmstadt	70664-3
Blockreagenz „Blocking Reagent for ELISA“	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	11112589001
Blut-Agar (Basis)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.10886
BugBuster® Protein Extraction Reagent	Fa. Novagen, über VWR GmbH, Darmstadt	70921-4
Colistinsulfat	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	CN31.3
D-Glukose-Monohydrat	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	4074
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	6580
Dinatriumkarbonat, $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	6392
Eisessig (Rotipuran® Essigsäure 100 %)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3738.2
Enrofloxacin	Biochemika Fluka, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	17849
Erythromycin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	856193
Ethanol abs.	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.00983.1011
Ethidiumbromid 1 %-ige Lösung	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
Ficoll 400	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	17.0400.01

Fortsetzung der **Tabelle 32** auf der nächsten Seite

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Fötales Kälberserum (FKS), dialysiert	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	A15-101
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Molekularmassenstandard)	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0322
Glyzerin	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	8.18709
Hefe-Extrakt	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.03753
HEPES	Fa. Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg	5288
Kaliumchlorid, KCl	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	4936
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	4873
Kalziumchlorid-dihydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	2382
Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2$ (50 mM)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Magnesiumsulfat-heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	5886
Mitomycin C	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	M0503
MTT [3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid]	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	M2128
Mueller-Hinton-Bouillon	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.10293
Nährgelatine, Nutrient Gelatin	Fa. Oxoid GmbH, Wesel	CM0635
Natriumchlorid, NaCl	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3957.2
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	6345
Na-EDTA, EDTA-Disodium	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11280
Natriumhydrogenkarbonat, $\text{NaHCO}_3$	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	6329
Natriumhydroxid, NaOH	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	6771.1
Neomycintrisulfat	Biochemika Fluka, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	72137

Fortsetzung der **Tabelle 32** auf der nächsten Seite

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
NH <sub>4</sub> -Mix (10 x PCR-Puffer)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Norfloxacin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	N9890
Nukleotide, dNTP	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	PAN 739026
PANScript DNA-Polymerase (5 U/μl)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	P11-010
rLysozyme <sup>TM</sup> Solution	Fa. Novagen, über VWR, Darmstadt	71110-3
RPMI 1640 Medium (mit 2 mM stab. L-Glutamin und 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	P04-18500
Salzsäure, HCl 32 %	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.00319.2511
Schaffblut (defibriert)	Institutseigene Gewinnung	-
Schwefelsäure 95 – 97 %	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.00731.1000
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	2326.2
SIFIN VT 135/6-B9 (Maus-mAk- anti-Stx2 in Thiomersal), Peroxidase-markiert	Fa. Sifin Diagnostics GmbH, Berlin	TS 2105
SIFIN VT 136/8-H4 (Maus-mAk- anti-Stx2) in Natriumazid	Fa. Sifin Diagnostics GmbH, Berlin	TS 2107
Standard-I-Nährbouillon	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.07882
Stx2, aufgereinigt	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	V2513
Tetrazyklin-HCl	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	T3383
TMB-Reagenz „Blue Star“ (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine)	Fa. Diarect AG, Freiburg	DIA 91000
Tris (Tris-Hydroxymethyl- Aminomethan)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4855.2
Trypanblau	Dr. G. Grübler & Co., Leipzig	-
Trypsin (2,5 %)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	L-11-001
Tween 20 <sup>®</sup>	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	8.22184

Fortsetzung der **Tabelle 32** auf der nächsten Seite

---

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nr.</b>
Xylene Cyanol FF	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	38505

---

**Tabelle 33:      Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nr.</b>
6-Well-Platte, steril	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	140675
6-Well-Platte, steril	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	657185
12-Well Platte CELLSTAR® Suspension, steril	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	665102
Ausstreichspatel PS, T-Form, 3,5 mm	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	12.541.5101
Dialyseschlauch MembraCell™ MWCO 3500, Ø16 mm	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	44310
Einmalösen	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	731170
Einmalpipetten, steril 5/10/25 ml	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	606180/ 607180/ 760180
Einmalspritze, 2 ml	Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen	4606027V
Einmalspritze, 50 ml	BD Plastipak, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	300865
Erlenmeyerkolben, verschiedene Volumina	Fa. Brand GmbH & Co KG, Wertheim Fa. Schott Duran® AG, Mainz	-
Filtereinheit Whatman® Rotrand FP 30/0,2 CA-S 0,2 µm	Fa. Schleicher & Schuell GmbH, über Fisher Scientific GmbH, Nidderau	10462200
Mikrotiterplatten, U96 Polysorp	Fa. Nunc, über Fisher Scientific GmbH, Nidderau	475434
Mikrotiterplatten, 96-F, steril	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	167008
Mikrotiterplatten, 96-U, steril	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	163320
Multipipettenspitzen 5 - 200 µl	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	8156.1
Multipipettenspitzen 0,5 - 200 µl	Fa. FinnTip, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	9400230

Fortsetzung der **Tabelle 33** auf der nächsten Seite

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nr.</b>
Objekträger, geschnitten	Fa. IDL GmbH & Co., Nidderau, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	3872872
Pasteurpipetten, 15 cm	über MAGV GmbH, Rabenau- Londorf	-
PCR-Reaktionsgefäße	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	04.022.1100
Petrischalen, steril, 92 x 16 mm	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	09.031.0000
Pipettenspitzen blau (100 - 1000 µl)	Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich	2100611
Pipettenspitzen gelb (10 - 100 µl)	Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich	2100601
Pipettenspitzen kristall (0,5 - 10 µl)	Fa. Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe	07.812.0000
Pipettenspitzen 5 - 350 µl	Fa. BioHit, Rosbach v. d. Höhe	780033
Pipettenspitzen Mehrkanal 2 - 200 µl, 20 - 300 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030000897
Plastibrand Einmal-Küvette (1,5 ml, halbmikro)	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	759015
Polypropylenröhrchen CELLSTAR®, 15 ml	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	188271
Polypropylenröhrchen CELLSTAR®, 50 ml	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	227261
Polypropylenröhrchen CELLSTAR®, 50 ml braun, lichtgeschützt	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	227280
Reagenzgläser	Fa. Schott Duran® AG, Mainz Medizin- und Labortechnik E. Reinke, Gießen	-
Reaktionsgefäße 1,5 ml Safe Lock	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	120.086
Reaktionsgefäße 2,0 ml Safe Lock	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	120.094
Spritzenfilter Rotilabo® 0,22 µm PVDF, steril	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	P666.1
Vorfilter Millex® GV	Fa. Millipore, über Fisher Scientific GmbH, Nidderau	3422407
Waschmembran für ELISA-Platten- Waschvorrichtung	Fa. Corning Inc., NY, USA, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	7610
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	658175

## 9.2 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

### Blockpuffer

Blockreagenz 27 g  
*A. demin.* ad 100 ml

### BugBuster® Gebrauchslösung

BugBuster® Protein Extraction Reagent 10 x 1 ml  
Tris-HCl, 1 M, pH 8,0 9 ml  
Benzonase® Nuclease 250 U  
rLysozyme™ Solution 10 kU

### CaCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 M

CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O 73,51 g  
*A. demin.* ad 500 ml

### Coating-Puffer (pH 10,33)

#### Lösung A (0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,12 g  
*A. demin.* ad 100 ml

#### Lösung B (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>)

NaHCO<sub>3</sub> 1,68 g  
*A. demin.* ad 100 ml

### Gebrauchslösung

Lösung A 17 ml  
Lösung B 8 ml

### Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (1 x TAE)

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE) 200 ml  
*A. demin.* ad 10 l

### Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

Tris 242 g  
Eisessig 57,1 g  
Na-EDTA • 2 H<sub>2</sub>O (0,5 M, pH 8,0) 100 ml  
*A. demin.* ad 1.000 ml

### Gelatine-Lösung, 2 %-ig

Nährgelatine 2 g  
*A. demin.* ad 100 ml

**HEPES-EDTA 0,1 %**

HEPES-Puffer-Stammlösung	100 ml
Na-EDTA • 2 H <sub>2</sub> O	1 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**HEPES-Puffer (1 x, pH 7,4)**

HEPES-Puffer Stammlösung (10 x, pH 7,4)	100 ml
<i>A. demin.</i>	900 ml

**HEPES-Puffer-Stammlösung (10 x, pH 7,4)**

NaCl	80 g
HEPES	23,8 g
KCl	3 g
D-Glukose	22 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**Ladepuffer (6 x)**

Xylene Cyanol FF	25 mg
Ficoll 400	1,5 g
<i>A. demin.</i>	9,5 ml
aliquotiert (1 ml), Lagerung bei -20 °C	

**Luria-Bertani-Agar (LB-Agar) = Bottom-Agar**

Bacto™-Agar	15 g
Bacto™-Tryptone	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml
NaOH 1 N	pH ad 8,2

**Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)**

Bacto™-Tryptone	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml
NaOH 1 N	pH ad 8,2

**Luria-Bertani-Weichagar = Top-Agar**

Bacto™-Agar	7 g
Bacto™-Tryptone	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml
NaOH 1 N	pH ad 8,2



**McFarland-Standard 0,5**

BaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O, 1 %	0,05 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 %	9,95 ml

**MgSO<sub>4</sub>-Lösung, 1 M**

MgSO <sub>4</sub>	123,24 g
<i>A. demin.</i>	ad 500 ml

**MTT-Lösung (5 mg/ml)**

MTT	0,5 g
PBS-Puffer-Gebrauchslösung	100 ml

**Mueller-Hinton-Bouillon**

Mueller-Hinton-Bouillon	21 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**NaCl-Lösung (0,89 %)**

NaCl	8,9 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**NaOH, 1 N**

NaOH	40,01 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**Na-Phosphatpuffer pH 6,0 nach Sambrook *et al.* (1989)**

0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	12 ml
0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	88 ml

**PBS-Puffer-Gebrauchslösung (1 x, pH 7,4)**

PBS Stammlösung (10 x)	100 ml
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**PBS-Stammlösung (10 x, pH 7,4)**

KCl	2,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g
NaCl	100 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	18 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**PBS-Tween (1 x, pH 7,2)**

PBS-Tween-Konzentrat (20 x, pH 7,2)	100 ml
<i>A. demin.</i>	ad 2.000 ml

**PBS-Tween-Konzentrat (20 x, pH 7,2)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	20 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	18,8 g
NaCl	327,2 g
Tween 20	20 ml
<i>A. demin.</i>	ad 2.000 ml

**Schafblutagar (BA)**

Blut-Agar (Basis)	50 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**SDS-Lösung (1 %-ig in NaCl)**

SDS (Na-Dodecylsulfat)	0,5 g
NaCl-Lösung (0,89 %)	50 ml

**SDS-Lösung (10 %-ig, 0,01 N HCl)**

SDS (Na-Dodecylsulfat)	100 g
HCl 1N	10 ml
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**SM-Puffer**

NaCl	5,8 g
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	2 g
1 M Tris-HCl, pH 7,5	50 ml
Gelatine-Lösung, 2 %-ig	5 ml
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**Stichagar**

Standard-I-Nährbouillon	25 g
Bacto™-Agar	2 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml

**Stopplösung (0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95 - 97 %)	15 ml
<i>A. demin.</i>	ad 585 ml

**Tris-HCl pH 7,5**

Tris	121,14 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml
HCl 32 %	ad pH 7,5

**Tris-HCl pH 8,0**

Tris	121,14 g
<i>A. demin.</i>	ad 1.000 ml
HCl 32 %	ad pH 8,0

**Trypanblau-Lösung**

Trypanblau	0,2 g
NaCl-Lösung (0,89 %)	ad 1.000 ml

**Trypsin-Gebrauchslösung (0,25 %)**

Trypsin (2,5 %)	100 ml
HEPES-EDTA 0,1 %	ad 1.000 ml

**Zellkulturmedium (=RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin)**

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	890 ml
FKS	100 ml
Penicillin (10.000 IE/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung	10 ml

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind danke ich für die Bereitstellung des Themas und die fachliche Betreuung der Arbeit. Sein umfangreiches Wissen, seine konstruktiven Diskussionen, aber auch sein Auge für Schwachstellen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. em. Dr. Dr. habil. Georg Baljer bedanke ich mich für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die großzügige Bereitstellung der Verbrauchsmaterialien.

Großer Dank gilt Frau Dr. Stefanie Barth für die intensive fachliche Betreuung der Arbeit, auch über die Zeit am IHIT hinaus, sowie für die Hilfe in jeglicher Computer-Notlage. Ihr danke ich besonders für die Unterstützung bei der Beantragung des Stipendiums sowie für die Subtypisierung der STEC-Stämme.

Frau Dr. Julia Fröhlich danke ich herzlich für die weitere motivierte Betreuung der Arbeit, für ihre Geduld und ihren Humor.

Der Marianne und Dr. Fritz Walter Fischer-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft e. V. danke ich für die Finanzierung im Rahmen eines Promotionsstipendiums.

Bei Anja Schwanitz möchte ich mich für die Einarbeitung im Labor sowie ihre tatkräftige Unterstützung bedanken. Außerdem danke für das gelegentliche Zurückholen auf den Boden der Tatsachen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Gabi Köpf für ihre Ideen und Hilfestellung bei kniffligen Fragen, die Ausweichmöglichkeit ins Nebenlabor und für ihre Freundschaft.

Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg der AG Biomathematik und Datenverarbeitung sei gedankt für die vielen Rechenläufe, für Geduld und Ausdauer bei den mehrstündigen Statistik-Besprechungen. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dipl.-Soz. Wolf Riepl, Social Science Research Dresden, für die fachkundige Unterstützung bei der weiteren statistischen Auswertung der Daten.

Danke an die Doktoranden – die guten alten Zeiten, ich habe sie nicht vergessen. Danke an Ahmad, Carsten, Christiane (Miu), Daniela, Hakan, Julia Fröhlich, Julia Heimbach, Katharina, Maïke, Melanie, Pablo, Sabrina und Simone für ein tolles Arbeitsklima, Abende mit DVD, Pizza und Fußball-EM. Dieser Zusammenhalt ist nicht selbstverständlich und hat ganz wesentlich dazu beigetragen, die Doktorandenzeit als positive Erfahrung zu verbuchen. In diesem Zusammenhang sei auch den restlichen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Miteinander gedankt. Liebe Christiane, danke, dass Du immer ein Ohr und ein Bett für mich übrig hast!

Danke, Christian, mein Fels! Für ALLES. Für Deine Geduld, Deine bedingungslose Unterstützung und Deinen steten Glauben daran, dass ich es schaffe.

Herzlichen Dank auch an meine Freunde in Dresden und an die Pfälzerin im Exil, Ute, die eine echte Krawallschnecke ist, was sie aber umso liebenswerter macht.

Bei meiner Familie bedanke ich mich dafür, dass ich immer ihre volle Unterstützung erfahren durfte. Das Studium und die sich anschließende Doktorandenzeit haben ihnen starke Nerven abverlangt. Danke, dass ich meinen Traumberuf verwirklichen durfte.

Alles wird gut!

## **Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Dresden, 19.08.2015

Ines Maria Jost





**ISBN 978-3-86345-306-0**



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH  
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375  
E-Mail: [info@dvg.de](mailto:info@dvg.de) · Internet: [www.dvg.de](http://www.dvg.de)